

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA**  
**SVILUPPO E RIPRODUZIONE UMANA**

Ciclo 22

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/17**

**TITOLO TESI**  
**CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE DA**  
**MOLTEPLICI TESSUTI ADULTI: CARATTERISTICHE**  
**CONDIVISE E TESSUTO-SPECIFICITA'**

**Presentata da: Dott. Giacomo Lanzoni**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof.ssa Elisabetta Caramelli**

**Prof. Gian Paolo Bagnara**

**Esame finale anno 2010**

## Indice

<b>1 – Introduzione</b>	<b>4</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>1.1 – Cellule staminali</li> <li>1.2 – Cellule staminali adulte                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.2.1 – Caratterizzazione e differenziamento</li> <li>1.2.2 – Cellule staminali mesenchimali (MSC)</li> </ul> </li> <li>1.3 – Plasticità differenziativa</li> <li>1.4 – Potenziali usi delle cellule staminali adulte                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1 – Biologia di base delle cellule staminali</li> <li>1.4.2 – Trattamento di malattie genetiche o degenerative</li> </ul> </li> <li>1.5 – MSC in molteplici tessuti adulti                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.5.1 – Placenta, membrana amniotica, corion, gelatina di Wharton del cordone ombelicale,</li> <li>1.5.2 – Polpa dentale</li> </ul> </li> <li>1.6 – MSC e immunomodulazione</li> <li>1.7 – MSC e malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.7.1 – Cellule staminali intestinali</li> <li>1.7.2 – Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)</li> <li>1.7.3 – Miofibroblasti subepiteliali (SEMF) e riparo</li> <li>1.7.4 – Effetti trofici delle SEMF</li> <li>1.7.5 – SEMF ed immunomodulazione</li> <li>1.7.6 – Cellule staminali da midollo osseo e IBD</li> </ul> </li> <li>1.8 – MSC e diabete                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.8.1 – Pancreas endocrino: isole di Langerhans</li> <li>1.8.2 – Diabete Mellito</li> <li>1.8.3 – Terapie farmacologiche e trapianto</li> <li>1.8.4 – Problematiche legate al trapianto</li> <li>1.8.5 – Sviluppo embriologico del pancreas endocrino</li> <li>1.8.6 – Cellule staminali pancreatiche</li> <li>1.8.7 – Induttori del differenziamento pancreatico endocrino</li> </ul> </li> <li>1.9 – Frazionamento di MSC in Campo Flusso                             <ul style="list-style-type: none"> <li>1.9.1 – Frazionamento in Campo Flusso (FFF)</li> <li>1.9.2 – Frazionamento in Campo Flusso Gravitazionale (GrFFF)</li> <li>1.9.3 – Variante NEEGA-DF per il frazionamento di MSC</li> </ul> </li> </ul>	
<b>2 – Obiettivi</b>	<b>41</b>
<b>3 - Materiali e Metodi</b>	<b>43</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>3.1 – Materiali</li> <li>3.2 – Attrezzature</li> <li>3.3 – Allestimento di colture primarie e stipiti di MSC                             <ul style="list-style-type: none"> <li>3.3.1 – Isolamento                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>Midollo osseo, Polpa Dentale, Membrana Amniotica, Corion, Gelatina di Wharton, Mucosa e Sottomucosa intestinale, Isole Pancreatiche</li> </ul> </li> <li>3.3.2 – Espansione</li> <li>3.3.3 – Caratterizzazione immunofenotipica e citofluorimetria</li> <li>3.3.4 – Frazionamento in NEEGA-DF</li> </ul> </li> <li>3.4 – Differenziamenti <i>in vitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>3.4.1 – Differenziamento osteogenico</li> <li>3.4.2 – Differenziamento adipogenico</li> <li>3.4.3 – Differenziamento angiogenico</li> <li>3.4.4 – Differenziamento condrogenico</li> <li>3.4.5 – Differenziamento miogenico</li> <li>3.4.6 – Differenziamento pancreatico endocrino</li> <li>3.4.7 – RT-PCR</li> <li>3.4.8 – Saggio istochimico di Von Kossa</li> <li>3.4.9 – Saggio istochimico Red Oil</li> <li>3.4.10 – Saggio di organizzazione su Matrigel</li> <li>3.4.11 – Saggi immunoistochimici</li> <li>3.4.12 – Saggi di immunofluorescenza</li> </ul> </li> <li>3.5 – Prove di immunomodulazione</li> <li>3.6 – Coculture con linee epiteliali</li> <li>3.7 – Formazione di aggregati isola-simili</li> <li>3.8 – Marcatura per <i>in vivo cell tracking</i></li> <li>3.9 – Trapianto <i>in vivo</i> in ratti STZ – diabetici</li> <li>3.10 – Considerazioni etiche</li> </ul>	

## **4 – Risultati e Discussione**

**58**

- 4.1 – Popolazioni simili alle MSC possono essere isolate da molteplici sorgenti
- 4.2 – Gli immunofenotipi evidenziano caratteristiche comuni e specificità legate alla sorgente
- 4.3 – Il frazionamento delle popolazioni in NEEGA-DF evidenzia profili frattografici specifici per ciascuna sorgente
- 4.4 – Il potenziale differenziativo in vitro delle MSC dalle diverse sorgenti non è sovrapponibile
  - 4.4.1 – Differenziamento Osteogenico
  - 4.4.2 – Differenziamento Adipogenico
  - 4.4.3 – Differenziamento Condrogenico
  - 4.4.4 – Differenziamento Angiogenico
  - 4.4.5 – Potenzialità differenziativa di AM-MSCs
- 4.5 – MSC da diverse sorgenti possiedono attività immunomodulatorie soppressive
- 4.6 – L'effetto immunomodulatorio soppressivo correla con i livelli di produzione di HLA-G
- 4.7 – MSC intestinali possiedono funzioni trofiche ed immunomodulatorie utili per impieghi in contesti di IBD
- 4.8 – Cellule MSC-simili da isole pancreatiche mostrano potenziale differenziativo endocrino
- 4.9 – Cellule MSC-simili da isole pancreatiche trapiantate in ratti STZ-diabetici hanno effetto sul fenotipo diabetico

## **5 – Bibliografia**

**74**

## **6 – Lista delle Pubblicazioni Scientifiche**

**89**

# 1 – Introduzione

Gli studi riguardanti le cellule staminali stanno vivendo un rapido sviluppo. Si tratta di un ambito di ricerca di grande interesse, non solo dal punto di vista scientifico e medico. Si percepisce ottimismo circa il potenziale impatto di queste cellule nello studio e nel trattamento di numerose condizioni patologiche: esso deriva dalla consapevolezza, propria non solo del clinico e del ricercatore ma anche del paziente e del grande pubblico, che terapie basate su cellule staminali si sono già dimostrate valide in clinica. Pratiche quali il trapianto di cellule staminali emopoietiche, epidermiche e corneali sono realtà rivoluzionarie.

La mole di risultati conseguiti, dalla ricerca di base sino al letto del paziente, è imponente. Altrettanto grande è lo sforzo che resta da fare per rendere le cellule staminali degli strumenti robusti per comprendere ed aggredire le patologie degenerative.

Chi sono, dove si trovano, come funzionano le cellule staminali nel loro ambiente naturale, ovvero nei tessuti, ogni giorno? Che compiti sono in grado di svolgere, ed in quali circostanze potremmo far fruttare le loro capacità?

Per rispondere a questi interrogativi e trasformare poi la conoscenza in medicina sarà necessario grande impegno.

Forse, abbiamo appena incominciato.

## 1.1 - Cellule staminali

Il concetto di cellule staminali nacque alla fine del XIX secolo come postulato teorico per descrivere la capacità auto-rigenerativa di alcuni tessuti: tessuti costituiti per la maggior parte da cellule con una durata di vita limitata necessitano di una quantità di cellule deputate a sostenere il rinnovamento dei tipi cellulari funzionali per l'intera vita dell'organismo. Saggi biologici rigorosi furono dunque sviluppati per valutare il potenziale di cellule candidate al ruolo di staminali. Per definire una cellula come staminale sono utilizzati quattro criteri<sup>1</sup>.

- Per prima cosa la cellula deve poter andare incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari di auto-mantenimento, un prerequisito per sostenere una popolazione cellulare.

- In secondo luogo le cellule figlie derivate da una singola cellula staminale devono poter differenziare in almeno un diverso tipo cellulare rispetto a quello della staminale.

- Il terzo criterio per definire la staminalità riguarda la capacità delle cellule di ripopolare il tessuto di origine se trapiantate in un sito ricevente danneggiato.

- Un ultimo criterio, meno condiviso e meno consolidato, è che le cellule staminali devono essere in grado di contribuire con una progenie differenziata *in vivo* anche in assenza di danni tissutali.

Sono state individuate e descritte cellule con caratteristiche di staminalità in tessuti embrionali, fetali, ed adulti. Tra le cellule staminali adulte, già da lungo tempo sono state identificate le cellule staminali emopoietiche (HSC) da cui si originano tutte le cellule emopoietiche, più



di recente sono state scoperte cellule staminali nervose (NSC) da cui differenziano neuroni, astrociti ed oligodendrociti, cellule miosatelliti del muscolo scheletrico, condroblasti pericondrali della cartilagine, cellule ovali del fegato, cellule staminali dello strato basale dell'epidermide, cellule staminali della cornea<sup>2-6</sup>. Più di recente sono state le cellule staminali mesenchimali (MSC) a catalizzare l'interesse dei ricercatori<sup>3</sup>.

Le cellule staminali embrionali (ESC), ottenute a partire dalla massa interna della blastocisti, rispondono a tutti i criteri di staminalità<sup>7,8</sup>: esse possono essere espanse in stato indifferenziato indefinitamente, sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari adulti se iniettate in una blastocisti ricevente in sviluppo. Le ESC possono differenziare funzionalmente in cellule di tutti i tessuti adulti, come dimostrato da esperimenti di generazione di animali chimerici vitali, in cui le ESC wild-type iniettate compensano difetti letali presenti nella blastocisti ricevente<sup>9</sup>, e di generazione di topi vitali a partire da blastocisti tetraploidi<sup>10</sup>.

## 1.2 - Cellule staminali adulte

### 1.2.1 - Caratterizzazione e differenziamento

I criteri di staminalità sono stati ampiamente validati con le cellule HSC. Una singola HSC può andare incontro a divisioni di auto-mantenimento generando un clone che può dare origine a tutti gli elementi del sangue, può ricostituire il sistema emopoietico in un trapianto in riceventi letalmente irradiati, può attecchire e differenziare anche se il ricevente non è stato irradiato<sup>11</sup>. Nel modello murino le HSC sono state purificate sin quasi all'omogeneità basandosi sulle caratteristiche della superficie cellulare: le HSC esprimono CD45, Thy1, c-Kit e Sca-1 mentre non esprimono gli antigeni di *lineage* (Lin)<sup>12</sup>. Nel topo, le HSC non esprimono nemmeno livelli significativi dell'antigene CD34<sup>13</sup>. Le HSC possono essere purificate, grazie alla separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS)<sup>13</sup>, basandosi sulla loro abilità di eliminare il colorante Hoechst per mezzo del trasportatore ABC/breast cancer receptor protein (BCRP-1)<sup>14</sup>. Potendo dunque essere separate in questa maniera (popolazione Hoechst<sup>low</sup>) esse sono generalmente chiamate "Side population" (Sp). Nell'uomo la purificazione delle HSC può essere ottenuta utilizzando un simile criterio<sup>16</sup>. Anche le HSC umane non esprimono antigeni di *lineage*, non esprimono CD 38, esprimono CD45, c-Kit e Thy1<sup>17,18,19</sup>. A differenza delle HSC di topo, la maggior parte delle HSC umane sono presenti nella frazione CD34<sup>+</sup> del midollo osseo (BM), del sangue periferico (PB) e cordonale (UCB). Non è chiaro se le HSC umane siano state purificate sin quasi all'omogeneità, come è stato fatto per le HSC murine, dato che la caratterizzazione delle HSC umane dipende da uno xenotrapianto. E' necessario un minimo di 200-500 cellule per ottenere una progenie emopoietica in topi o pecore immunodeficienti<sup>19</sup> ed ancora non è stato dimostrato se ciò dipenda dalla natura xenotropica del saggio di trapianto o se possa riflettere la carenza di purezza delle HSC umane. Una prova del fatto che una singola HSC può differenziare in molteplici *lineage* emopoietici viene dai trapianti di

una singola HSC in topo<sup>13</sup>. Ancora più solidi sono i dati ottenuti mediante una tecnica di marcatura retrovirale. Siccome i retrovirus si integrano in regioni casuali del DNA della cellula ospite, le sequenze fiancheggianti l'integrante virale sono cellula-specifiche e possono essere sfruttate per seguire la progenie di singole cellule *in vitro* ed *in vivo*. Questo approccio è stato sfruttato per dimostrare che una singola cellula sia di topo<sup>20</sup> che di uomo<sup>21</sup> può dare origine a molteplici cellule di progenie. Inoltre questa tecnica ha permesso la dimostrazione che singole HSC vanno incontro a divisioni di auto-mantenimento e che le molteplici cellule figlie hanno potenziale differenziativo in più *lineage*<sup>20</sup>.

Di recente questi criteri sono stati applicati per identificare altre cellule staminali adulte. Per esempio le NSC possono essere purificate dal cervello umano usando una combinazione di anticorpi contro CD133 e CD24<sup>6</sup>. Le cellule CD133+ CD24- generano aggregati (neurosfe) che possono essere ulteriormente coltivati dando origine ad astrociti, oligodendrociti e neuroni<sup>22</sup>.

A differenza delle ESC, le cellule staminali adulte hanno una minore capacità di automantenimento, in parte a causa di una carenza di alti livelli di attività delle telomerasi - livelli comunque molto superiori a quelli medi delle cellule somatiche<sup>48</sup>. Si riteneva inoltre che il ventaglio di possibili citotipi generabili da una cellula staminale adulta fosse ridotto e ristretto ai tipi del tessuto di origine. Numerosi dati si sono però accumulati in favore di una elevata plasticità differenziativa di alcune popolazioni di cellule staminali adulte.

### **1.2.2 - Cellule Staminali Mesenchimali (MSC)**

Nell'ambito degli studi sulla emopoiesi, numerosi lavori evidenziarono la presenza nel midollo osseo di una popolazione di cellule staminali diversa da quella delle HSC, localizzata nello stroma. L'interesse dei ricercatori si focalizzò dunque non più sul ruolo dello stroma come supporto all'emopoiesi, ma sulle potenzialità delle diverse cellule staminali in esso contenute.

Esperimenti classici avevano dimostrato che il trapianto di midollo osseo in siti anatomici eterotopici risultava nella formazione di tessuto osseo e midollo ectopici. Esempi di questi studi sono datati addirittura nel XIX secolo (Goujon, 1869), e prove chiare del potenziale osteogenico associato con il midollo osseo furono portate nel 1968 da Tavassoli e Crosby. Si trattava però di indagini riguardanti interi frammenti di midollo, non poteva essere delineata l'identità di cellule che funzionassero come progenitori delle cellule ossee differenziate.

Alexander Friedenstein, Maureen Owen e i loro collaboratori furono i primi ad utilizzare colture *in vitro* e trapianti in animali da laboratorio per caratterizzare il potenziale della sottopopolazione di cellule costituenti lo stroma midollare<sup>78</sup>. Essendo lo strato di matrice extracellulare nel midollo estremamente sottile, si può facilmente ottenere una sospensione unicellulare di cellule midollari stromali ed emopoietiche con semplice aspirazione e rottura meccanica. Una volta piastrate a bassa densità, le cellule stromali di midollo (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells, BM-MSCs) aderiscono rapidamente e possono quindi essere separate dalle cellule emopoietiche non aderenti mediante lavaggi

ripetuti. Con appropriate condizioni colturali si formeranno distinte colonie, ognuna delle quali derivante da un singolo precursore, inizialmente definito come Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F)<sup>79</sup>. Il trapianto in vivo dimostrò che diversi tessuti scheletrici (osso, cartilagine, tessuto adiposo e tessuto fibroso) potevano essere generati sperimentalmente dalla progenie di una singola cellula stromale di midollo, o cellula staminale osteogenica.

I termini CFU-F o fibroblasti stromali di midollo sono stati per lo più abbandonati e sostituiti da altri quali cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule stromali midollari, cellule stromali mesenchimali, cellule progenitrici mesenchimali. Non esiste ancora una nomenclatura univoca, ma tutte le definizioni si riferiscono ad un particolare tipo di cellule aderenti, mononucleate, derivate da midollo, coltivate in un terreno classico (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) supplementato solo con siero fetale bovino (FBS), comunemente riferite come MSC.

Tali cellule hanno una morfologia simile ai fibroblasti, con una scarsa quantità di citoplasma, pochi mitocondri ed un apparato del Golgi poco sviluppato; possono essere espanse *ex vivo* e presentano un potenziale differenziativo verso almeno tre tipi cellulari mesenchimali: osteociti, condrociti, adipociti<sup>80</sup>. Numerosi ulteriori commissionamenti, di tipo mesenchimale e non, furono in seguito ottenuti sia *in vitro* che *in vivo*. Il termine “cellule staminali mesenchimali” è però oggetto di discussione: esso trasmette assunzioni che non erano incluse nel concetto originale di cellule staminali osteogeniche e non è supportato, ad ora, da dirette evidenze sperimentali.

Mediante il saggio di formazione delle colonie di fibroblasti (CFU-F) è stato possibile stimare le cellule mesenchimali di midollo nel numero di una ogni  $10^4$  -  $10^5$  cellule mononucleate. Per verificare l'omogeneità delle colonie sono stati eseguiti dei saggi di differenziamento *in vitro*, i quali hanno evidenziato la presenza di sottopopolazioni nella popolazione stromale mesenchimale, comprendenti cellule con il solo potenziale osteogenico o cellule in grado di differenziare anche in senso adipogenico o condrogenico. L'eterogeneità della popolazione di cellule stromali midollari è stata confermata anche da studi *in vivo* che dimostrano come solo alcune colonie derivino da cellule mesenchimali staminali, mentre le altre originerebbero da precursori più maturi, con un potenziale differenziativo limitato. Di qui nacque la necessità di una caratterizzazione fenotipica che consentisse di identificare e isolare prospetticamente le vere cellule staminali mesenchimali<sup>82</sup>.

Già nel 1992, grazie agli studi condotti su cellule di fegato fetale, era stata ipotizzata l'esistenza di un precursore comune alla progenie mesenchimale ed emopoietica, caratterizzato come CD34+, CD38-, HLA DR-<sup>83</sup>. Nel microambiente midollare le cellule stromali producono i fattori di crescita necessari a promuovere l'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali responsive. La maggior parte delle cellule staminali è, in realtà, quiescente (in fase G0 del ciclo cellulare) e solo una piccola frazione risponde ai messaggi paracrini, differenziando nelle più commissionate CD34+ o nelle cellule staminali mesenchimali<sup>84</sup>.

Il marker CD34, una sialomucina<sup>85</sup> è espresso nei progenitori emopoietici e nelle cellule endoteliali vascolari ma non si trova sulle cellule staminali mesenchimali espanse *ex vivo*. Non si può escludere che questo

antigene sia espresso nelle cellule direttamente isolate dal midollo, e venga in seguito “down regolato” o modificato in una forma che non reagisce con l’anti-CD34 a seguito della coltura *in vitro*, oppure che l’antigene sia presente nelle cellule derivate dal fegato fetale e non sia, invece, molto espresso nelle cellule di midollo adulto. Va comunque sottolineato che le condizioni di coltura in vitro quali l’adesione alla superficie della fiasca, il siero fetale bovino o fattori di crescita possono determinare la perdita o l’acquisizione di recettori di superficie, alterando così il pattern di marcatori<sup>82</sup>. Si ritiene che il fingerprint fenotipico subisca continue modifiche in risposta al microambiente sia in vitro che in vivo e per questo motivo non è stata ancora ottenuta una caratterizzazione chiara ed inequivocabile<sup>79</sup>.

Sono numerosi gli antigeni la cui espressione caratterizza le MSC, nessuno di quelli individuati è però ad oggi esclusivo o altamente distintivo per le MSC.

Primo tra questi marcatori è l’antigene endoglina, o CD105, riconosciuto dall’anticorpo SH2<sup>86</sup>; si tratta di una glicoproteina di 97 kDa che lega ad alta affinità il TGFβ1 e III, ma non il TGFβII. Svolge un ruolo fondamentale nelle interazioni tra le cellule endoteliali e nello sviluppo dei vasi, media le interazioni tra MSC e le cellule emopoietiche nel midollo, potrebbe giocare un ruolo chiave nel differenziamento condrogenico mediante la trasduzione del segnale<sup>87</sup>.

Gli anticorpi monoclonali SH3 e SH4 riconoscono, invece, due epitopi differenti del CD73<sup>89</sup>, un antigene presente in molti tipi cellulari e in particolare nel tessuto linfoide ma non nei precursori emopoietici o negli osteociti. Si tratta di una proteina di membrana di 67 kDa, ancorata mediante glicosilfosfatidilinositolo, con attività nucleotidasica e capacità di trasdurre il segnale. Catalizza la defosforilazione dei ribo/desossiribonucleotidi nei corrispondenti nucleosidi; quest’attività potrebbe essere importante nel recupero di purine e pirimidine presumibilmente in tutte le cellule dove CD73 è espresso. Nel microambiente midollare il CD73 potrebbe mediare le interazioni cellula-cellula e rappresentare un elemento comune tra lo sviluppo stromale e linfocitario.

Altro marcatore delle cellule mesenchimali è l’antigene riconosciuto dall’anticorpo monoclonale SB10, identificato come ALCAM (activated leukocyte-cell adhesion molecule) o CD166, una glicoproteina implicata nel differenziamento in senso osteogenico<sup>90</sup>.

Ulteriori marcatori caratterizzanti sono stati studiati al fine di isolare prospetticamente le MSC mediante selezione immunomagnetica. Tra quelli maggiormente consolidati riportiamo: STRO-1, MCAM, CD146<sup>91, 92</sup>. Nuovamente, questi marcatori non sono esclusivi delle MSC ma permettono di purificare popolazioni fenotipicamente e funzionalmente omogenee, espandibili in vitro, dotate di capacità di automantenimento, di differenziamento verso commissionamenti mesenchimali e di supporto dell’emopoiesi<sup>92</sup>.

L’isolamento prospettico avrebbe il vantaggio di garantire manipolazioni minime sulle popolazioni cellulari, nell’ottica di un utilizzo in pratica clinica. Comunque, finché le sperimentazioni richiederanno l’utilizzo di cellule espanse in coltura, isolare progenitori clonogenici attraverso marcatori di superficie avrà lo stesso significato pratico di isolare attraverso aderenza su plastica.

### 1.3 – Plasticità differenziativa

*"It seems like everyone wants to be the first to show  
that an arm can give rise to a leg,  
and a nose to an ear."*

(S.J. Morrison. Stem cell potential: Can anything make anything? *Current Biology* 2001; 11:R7-R9)

Durante gli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi articoli che suggeriscono che le ipotesi di tessuto-specificità per le cellule staminali adulte potrebbero essere troppo stringenti. La capacità di cellule staminali di acquisire il destino di tipi cellulari diversi da quelli del tessuto di origine è stata definita "plasticità" delle cellule staminali adulte. Questi studi hanno generato un interesse notevole, ma hanno anche incontrato un importante scetticismo e rimangono ampiamente controversi: la maggior parte degli studi attende tutt'ora conferme indipendenti, la cosiddetta infedeltà di *lineage* compare a bassissima frequenza, non si dimostra che la plasticità è il risultato del differenziamento a livello di singola cellula in più *lineage* funzionalmente caratterizzati e, non da ultimo, queste infedeltà di *lineage* negano principi consolidati della biologia dello sviluppo.

La maggior parte degli studi ha mostrato la plasticità utilizzando cellule derivate da midollo osseo.

Gli studi di Friedenstein ed altri hanno dimostrato in maniera solida che MSC umane da midollo possiedono multipotenzialità a livello di singola cellula verso i commissionamenti di osteoblasti, adipociti, condrociti, fibroblasti e cellule reticolari avventiziali<sup>88</sup>, vanno di conseguenza consolidandosi le conoscenze sui fattori necessari per l'induzione in tali *lineage*, e sulle vie di segnalazione che sottintendono a tali processi.

Il potenziale differenziativo delle MSC sembrerebbe non fermarsi qui, benchè le evidenze per questi ulteriori commissionamenti siano più deboli e più controverse. E' stata messa in evidenza la potenzialità differenziativa *in vitro* verso *lineage* di muscolo striato, liscio e cardiaco<sup>93</sup>, con l'espressione di proteine muscolo-specifiche quali myoD, miogenina, desmina, alfa-actinina sarcomerica, etc; verso *lineage* endoteliali<sup>107</sup>, caratterizzati dall'espressione di proteine quali il fattore di Von Willebrand e dalla capacità funzionale di creare strutture simili ai capillari nel saggio su matrice della membrana basale (Matrigel); verso *lineage* neurali<sup>32</sup>, con l'espressione di alti livelli di proteine specifiche e con l'adozione delle morfologie caratteristiche delle cellule neuronali; verso *lineage* epatocitari<sup>43,47</sup>, con le caratteristiche funzionali -captazione di Di-Ac-LDL, rilascio di albumina- nonché morfologiche delle cellule epatiche.

Gli studi *in vivo* si basano in gran parte sull'analisi dei tessuti di animali che abbiano ricevuto dosi letali di radiazioni ed un trapianto di midollo osseo o di cellule derivanti da midollo osseo di un donatore. Numerosi studi hanno mostrato la presenza nei vari tessuti del ricevente, benchè a bassissima frequenza, di cellule derivate da donatore differenziate in *lineage* mesodermici diversi dall'ematopoietico. I tessuti in cui è stato osservato contributo da donatore includono il muscolo scheletrico<sup>24,26</sup>, l'endotelio<sup>25,27,28</sup> e il muscolo cardiaco<sup>23,25,29</sup>. Sono ancora più sorprendenti gli studi che suggeriscono che le cellule di midollo osseo possano differenziare *in vivo* in cellule di tessuti di diversi foglietti embrionali. Numerosi studi suggeriscono che cellule di midollo osseo potrebbero

differenziare *in vivo* in cellule con morfologia e fenotipo neuroectodermici<sup>30-34</sup>. E' stato mostrato anche il differenziamento delle MSC in cellule con morfologia e fenotipo endodermici: Petersen e collaboratori furono i primi a mostrare che le cellule ovali di fegato in rigenerazione potrebbero derivare dal midollo osseo<sup>35</sup>. Scoperte simili sono state da allora riportate da numerosi gruppi<sup>36-39</sup> e sono state trovate cellule derivate dal midollo osseo di donatore in altri tessuti epiteliali di trapiantati, come la pelle ed il polmone. Considerando l'insieme, questi studi suggeriscono che nel midollo osseo, e possibilmente in altri tessuti, esistano cellule di natura multipotente, dotate di una notevole "plasticità".

Numerosi meccanismi potrebbero sottostare a questa apparente plasticità: cellule staminali tessuto-specifiche potrebbero essere presenti in molteplici organi differenti; la plasticità potrebbe essere il risultato della fusione delle cellule del donatore con le cellule residenti in un organo; le cellule potrebbero andare incontro a de-differenziamento e ri-differenziamento; oppure vere e proprie cellule staminali potrebbero persistere nella vita post-natale. Esistono dati a supporto di ciascuno dei quattro modelli e la questione è tutt'ora abbondantemente dibattuta.

Non esiste una definizione "ufficiale" di plasticità delle cellule staminali. Una definizione possibile è che cellule staminali adulte tessuto-specifiche, teoricamente commissionate verso un dato *lineage* cellulare, possono in particolari condizioni di microambiente acquisire l'abilità di differenziare in cellule di un tessuto differente. Questa definizione implica che: 1) differenti *lineage* cellulari devono poter derivare da una singola cellula iniziale, 2) i tipi cellulari differenziati devono mostrare funzionalità *in vitro* ed *in vivo* e 3) l'attecchimento deve risultare robusto e persistente in presenza (ed in assenza) di danno tessutale. Questi criteri possono essere utilizzati per valutare gli studi che descrivono la plasticità delle cellule staminali.

La maggioranza degli studi è stata compiuta in modelli animali roditori mentre un numero minore discute della plasticità negli umani. La maggior parte degli studi è basata su trapianti *in vivo* di cellule di sesso diverso o marcate con GFP o con beta-galattosidasi, in modo da poter ricercare la presenza del cromosoma Y o dei prodotti dei geni marcatori. Tuttavia è da sottolineare la presenza di limiti e falle nelle metodologie di rilevamento delle cellule del donatore utilizzando ciascuno dei precedenti sistemi<sup>62,63</sup>.

## 1.4 - Potenziali usi delle cellule staminali adulte

### 1.4.1 - Biologia di base delle cellule staminali

Le cellule staminali adulte rappresentano uno strumento molto potente per lo studio dell'autorinnovamento e del differenziamento. Anche nell'era precedente a quella della plasticità delle cellule staminali gli studiosi hanno utilizzato le cellule staminali e le cellule della loro progenie progressivamente commissionate per valutare gli effetti dei fattori di crescita e di altri segnali richiesti sul loro sviluppo. Con le conoscenze sul genoma e con le tecniche di analisi sul trascrittoma, le cellule staminali e la loro progenie commissionata possono essere

utilizzate per definire quali programmi genetici hanno bisogno di essere attivati od inattivati per portare al differenziamento cellulare.

Poiché alcune plasticità potrebbero essere causate da processi di sdifferenziamento e ridifferenziamento, gli studi mirati alla comprensione dei meccanismi genetici che sono alla base di questi processi potrebbero dare risultati importanti, anche nel campo dello studio del cancro. Una comprensione migliore dei fattori che governano questi processi dovrebbero portare ad un miglioramento nei metodi per l'induzione di sdifferenziamenti e ridifferenziamenti, il che potrebbe rendere questo fenomeno clinicamente rilevante.

L'analisi comparativa del profilo di espressione genica e proteica, delle richieste di fattori di crescita ed altri segnali cellulari delle cellule staminali commissionate ad un tessuto (come le HSC o le NSC), delle cellule staminali più primitive (come le MSC) e delle cellule pluripotenti quintessenziali (le cellule ES) hanno già apportato informazioni importantissime rispetto ai fattori per la pluripotenza ed il commissionamento. Questi risultati sono già esitati, per esempio, nella generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS cells), ottenute riprogrammando cellule adulte con i fattori di trascrizione caratterizzanti delle ESC.

#### **1.4.2 – Trattamento di malattie genetiche o degenerative**

Le HSC sono usate già da molte decadi per il trattamento di disordini ematologici o per curare quei pazienti con tumori maligni che subiscono chemioterapie o radioterapie intensive. E' immaginabile che con il progresso ottenuto nella caratterizzazione delle popolazioni di cellule staminali per altri tessuti -come le cellule staminali dei cheratinociti e le cellule staminali della cornea- la terapia con cellule staminali potrebbe diventare fondamentale per il trattamento di difetti ereditari o acquisiti in tali tessuti<sup>71</sup>.

Con l'individuazione di varie tipologie di staminali tessuto-specifiche, o di staminali adulte dotate di vasto potenziale differenziativo, si potrebbe giungere ad approcci terapeutici per disordini genetici o degenerativi di molti più organi. Oltre alle indagini sulle identità e sulle potenzialità differenziative delle cellule staminali, saranno necessari vasti studi per determinare come tali cellule potrebbero essere usate nella pratica clinica, e se esistano problematiche legate alla biologia o alla manipolazione delle cellule staminali trapiantate (ad esempio tumorigenicità, stabilità del differenziamento). Si dovrà investigare inoltre se i segnali *in vivo* possono essere sufficienti per indurre differenziamenti organo- e tessuto-specifici a livelli sufficienti per riparare l'organo bersaglio, o se sia necessario predifferenziamento *in vitro*. Sappiamo molto poco riguardo all' "homing" delle cellule staminali adulte verso microambienti non ematopoietici, sarà dunque necessario determinare se le cellule indifferenziate debbano essere infuse per endovena oppure localmente per ottenere livelli di attecchimento sufficienti per sostituire un tessuto non-emopoietico danneggiato. Inoltre, siccome potrebbe essere possibile che le richieste locali non siano sufficientemente forti da mediare efficientemente uno "switch" di *lineage*, sarà necessario testare se le cellule staminali debbano essere

predifferenziate *in vitro* prima dell'infusione in forma di cellule progenitrici commissionate oppure completamente mature.

Altre questioni riguarderanno il tipo di trapianto. Le cellule staminali adulte potrebbero essere infatti utilizzate in contesti autologhi o allogenic. Per malattie acute, quali ad esempio l'infarto o l'ictus, o per malattie con basi immunologiche come il diabete o le malattie infiammatorie croniche intestinali, il trapianto allogenico potrebbe essere necessario. Di conseguenza saranno necessarie strategie che evitino il rigetto immune.

Già oggi disponiamo di alcuni dati derivanti da trials clinici per l'utilizzo di MSC sull'uomo: tali cellule si sono già dimostrate utili nella cura dell'osteogenesi imperfetta<sup>105</sup> e, cotrapiantate con le HSC, nel trattamento della graft-versus-host disease (GvHD), come sarà discusso in seguito.

## 1.5 – MSC in molteplici tessuti adulti

Oltre che nel midollo osseo, cellule aderenti con attività proliferativa indipendente dalla densità possono essere ritrovate in numerosi connettivi, come il periostio e la polpa dentale. Il potenziale di fibroblasti formanti colonie (CFU-F, frequentemente nominate MSC) dai tessuti non emopoietici e dal midollo non sono stati comparati in maniera sistematica, ed in particolare non in test *in vivo*. Le evidenze che si stanno accumulando suggeriscono che le CFU-F da differenti tessuti non siano identiche. Le “MSC” isolate da polpa dentale, ad esempio, in condizioni di coltura e trapianto identiche a quelle usate per le BM-MSC producono dentina invece che osso (Gronthos 2002). Invece che ad una singola uniforme classe di MSC ubiquitarie, le evidenze indicano l'esistenza di una classe di progenitori clonogenici residenti in diversi tessuti ma dotati di potenzialità tessuto-specifiche.

Queste popolazioni possono essere confrontate a livello di immunofenotipo e di potenziale differenziativo *in vitro*, mentre per estensive indagini *in vivo* saranno necessarie metodiche fini di isolamento prospettico. Gli studi di Bruno Peault e collaboratori sull'isolamento prospettico di periciti vascolari mediante marcatori quali CD146 ed NG2 ed il trapianto in vivo rappresentano importanti eccezioni ed aprono nuovi interessanti scenari. I dati supportano infatti l'ipotesi che le cellule che danno origine alle colture di “MSC” siano nativamente associate alla parete dei vasi ed appartengano ad un subset di cellule perivascolari distribuite a molti livelli nei tessuti<sup>142, 143</sup>. La vastissima distribuzione delle cellule murali, o periciti, potrebbe spiegare perchè progenitori multipotenti simili siano distribuiti in una moltitudine di organi. Il ruolo fisiologico di queste cellule nella rigenerazione e nell'omeostasi dei tessuti rimane comunque ancora da dimostrare formalmente. L'utilizzo pratico di queste cellule, ampiamente espandibili in coltura fino a numeri “clinicamente” rilevanti ed in grado di mantenere a lungo termine il potenziale differenziativo, potrebbe comunque essere immaginabile anche senza dimostrazioni formali di derivazione e di ruolo fisiologico.



### **1.5.1 Placenta, Membrana Amniotica, Corion e Gelatina di Wharton del cordone ombelicale**

La placenta a termine rappresenta, da qualche anno, una fonte di cellule staminali di notevole interesse, sia per l'abbondanza di cellule che vi possono essere recuperate, sia per l'assenza di problemi etici nel suo utilizzo, trattandosi di un prodotto di scarto. Un'altra caratteristica importante è che le cellule derivanti da placenta sono progenitori di età naturale inferiore in confronto alle BM-MSC adulte, o a cellule dell'adulto in generale<sup>144</sup>.

La placenta è una struttura discoidale con la funzione primaria di garantire gli scambi nutritivi, di gas e di soluti tra madre e feto. È costituita da una parte di derivazione materna, la decidua basale e una fetale, il corion. Il feto è contenuto all'interno della membrana amniotica, immerso nel liquido amniotico, sempre di origine embrionale. La membrana amniotica, in contiguità al corion, è molto sottile ed avascolarizzata, ha la funzione di sostenere e proteggere il feto in crescita dal contatto con i tessuti della madre. La membrana è costituita internamente da uno strato di cellule epiteliali (AEC) che poggia su di una membrana basale, ed esternamente da uno stroma di tessuto connettivo o mesoderma amniotico in cui risiedono le cellule stromali mesenchimali amniotiche (hAMSC o AM-MSC).

Il corion prende contatto con la decidua endometriale materna. Si possono distinguere due regioni coriali: quella mesenchimale, da cui vengono isolate le cellule coriali mesenchimali stromali (hCMSC o COR-MSC) e quella trofoblastica, ovvero quella a diretto contatto con la madre, le cui cellule corrispondenti sono le coriali trofoblastiche (hCTC).

Tessuti associati alla placenta sono quelli del cordone ombelicale. Nel cordone ombelicale scorrono i vasi ombelicali immersi in un tessuto mesenchimale ricco di acido ialuronico, la gelatina di Wharton (WJ), che impedisce la formazione di occlusioni e costrizioni all'interno del cordone durante il movimento del feto. Dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale possono essere ottenute cellule mesenchimali stromali (WJ-MSC).

Le cellule estratte dalla placenta sono dotate di importanti capacità immunomodulatorie. Durante la gravidanza è a livello della placenta che viene mantenuta la tolleranza materno-fetale. Questa proprietà, in comune con le BM-MSCs, è dovuta alla scarsità di molecole MHC II e costimolatorie in membrana ed alla presenza delle molecole HLA-G. Esperimenti *in vitro* dimostrano che sia le cellule derivanti dalla membrana amniotica che le cellule corioniche riescono a sopprimere fortemente la proliferazione dei linfociti indotta da mitogeni o allo-antigeni, anche in maniera dose-dipendente. La loro azione si estende anche sugli altri tipi cellulari, come le antigen presenting cells, impedendone la maturazione. La loro azione è dovuta sia ad un contatto diretto cellula-cellula sia al rilascio di fattori solubili come IDO, TGF- $\beta$  e IL-10.

La membrana amniotica è attualmente utilizzata nella pratica clinica per trattare ulcere dermiche, ustioni e ulcere croniche oculari: non dà luogo a reazioni immunitarie di rigetto, non è dunque necessaria terapia immunosoppressiva<sup>145</sup>.

### **1.5.2 - Polpa dentale**

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno ottenuto risultati che indicano l'esistenza di cellule con caratteristiche di MSC residenti nella polpa dentale - una struttura stromale, fibrosa, altamente vascolarizzata, situata nella zona più interna del dente.

I progenitori mesenchimali della polpa nell'individuo adulto, DP-MS (Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells), derivano dalle più ancestrali ecto-mesenchimali embrionali responsabili dell'odontogenesi, che avviene durante lo sviluppo embrionale e prosegue dopo la nascita fino all'età adulta.

Le staminali adulte sono capaci di fornire la rigenerazione dei tessuti del dente nell'adulto, quali lo smalto e la dentina, soggetti ad insulti ed abrasione. I primi processi di differenziamento irreversibile, che porteranno alla formazione dei tessuti maturi del dente, cominciano nella papilla dentale: è qui che le cellule differenziano in odontoblasti deputati alla formazione della dentina primaria.

La riparazione della dentina è caratterizzata dall'attivazione, proliferazione e maturazione degli odontoblasti con deposizione di nuovo tessuto matriciale. I fattori di crescita e le molecole coinvolti nell'attivazione di questi precursori sono gli stessi che guidano la dentinogenesi in condizioni fisiologiche.

Lo stesso tessuto lesionato è responsabile della liberazione di componenti di deposito presenti nella matrice quali: DSP (dental sialo protein) e fattori di crescita (TGF- $\beta$ , BMP-7); inoltre ne stimola la secrezione attiva da parte delle cellule circostanti la zona lesionata.

In caso di lesioni patologiche, che causano la morte degli stessi odontoblasti e l'apertura di cavità erosive fino alla polpa, è stata dimostrata la parziale rigenerazione attraverso l'attivazione di progenitori mesenchimali, presenti nella polpa del dente, capaci di differenziare e specializzarsi in odontoblasti. Le staminali, in presenza di una segnalazione di necrosi nella dentina, proliferano, migrano nella zona e generano nuove cellule simil-odontoblastiche che secernono il nuovo strato riparatore, costituito da matrice mineralizzata, scarsamente organizzata, che funge da barriera protettiva per la polpa dentale. Le DP-MS umane sono state isolate in coltura dalla polpa dentale di denti molari e rivelano molte caratteristiche in comune con le mesenchimali del midollo osseo, BM-MS<sup>146-148</sup>.

## **1.6 - MSC e immunomodulazione**

Numerosi studi hanno descritto le peculiari caratteristiche immunologiche delle MSCs, quali la ridotta antigenicità e la potente attività immuno-modulatoria in senso soppressivo, proponendone un utilizzo clinico al fine di contrastare malattie immunomediate ed infiammatorie. Le MSCs condividono marcatori di superficie con le cellule dell'epitelio del Timo ed esprimono molecole di adesione per l'interazione con i linfociti T, quali la molecola di adesione cellulare

vascolare 1 e la molecola di adesione intracellulare 2. La ridotta antigenicità delle cellule MSCs è principalmente dovuta alla bassa espressione degli antigeni di istocompatibilità HLA di classe I ed alla completa assenza di molecole HLA di classe II e di molecole co-stimolatorie quali CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) e CD40. L'interesse applicativo delle MSCs è correlato alla loro capacità di sopprimere la proliferazione dei linfociti T indotta sia dagli agenti mitogeni che dagli alloantigeni che determinano il rigetto del trapianto. Inoltre le MSCs sono resistenti alla citossicità mediata dai linfociti T CD8+, inibiscono il differenziamento delle cellule dendritiche responsabili della presentazione antigenica, la proliferazione dei linfociti B limitando la produzione anticorpale e favoriscono la formazione di cellule T regolatorie. Nel loro complesso queste cellule sono di grado di mediare un'attività tolerogenica dose-dipendente sia nei confronti della risposta immunitaria innata che adattativa. La valutazione dei meccanismi responsabili dell'attività tolerogenica ha dimostrato la necessità di un contatto tra cellula mesenchimale e linfocita attivato e la secrezione di fattori solubili non espressi costitutivamente dalle MSCs ma indotti dal micro-ambiente. Numerose molecole solubili sono state associate all'attività inibitoria delle MSCs quali il fattore di crescita epatocitario (HGF), transforming growth factor-beta (TGF-beta), interleuchina-10 e -2 (IL10, IL-2), tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), e gli antigeni solubili HLA-G<sup>149</sup>.

Spaggiari e collaboratori<sup>150</sup> hanno dimostrato come le MSCs siano in grado di inibire la proliferazione delle cellule natural killer, l'espressione dei recettori NK attivatori (NKp44, NKp30, NKG2D) e l'induzione di funzioni effettrici, quali l'attività citotossica e la produzione di citochine tramite IDO. Recentemente dallo studio di MSCs nelle quali è stata inibita l'espressione del recettore 1 per interferone-gamma (IFN-gamma R1) si è dimostrato come l'inibizione della linfoproliferazione possa avvenire anche indipendentemente da IDO ed è stato proposto il sistema IGF/IGFBP nell'inibizione della proliferazione cellulare.

Considerando le proprietà tolerogeniche di HLA-G, in particolare la capacità di inibire la risposta linfoproliferativa, si è ipotizzato il coinvolgimento di queste molecole nell'attività immunomodulatoria delle MSCs. Gotherstrom e collaboratori hanno dimostrato la presenza di mRNA specifico per HLA-G sia nelle MSCs fetali che adulte e nostri studi successivi hanno confermato la modulazione degli antigeni HLA-G sulla membrana delle MSCs e la capacità di tali cellule di produrre, in presenza di uno specifico microambiente, molecole solubili HLA-G<sup>149</sup>.

E' da sottolineare una recente osservazione di Ning e collaboratori<sup>151</sup> sulla correlazione tra il co-trapianto di MSCs e l'aumento nella frequenza di ricaduta della patologia ematologica. La modulazione delle molecole HLA-G è considerata un evento favorevole nella gravidanza e nei trapianti d'organo, nei quali la regolazione della risposta immune cellulo-mediata rappresenta un evento essenziale per un esito positivo. Al contrario l'espressione di molecole HLA-G è associata a conseguenze cliniche negative nelle neoplasie ed infezioni virali, nelle quali la funzione tolerogenica di HLA-G permette alle cellule mutate/infettate di "sfuggire" alla risposta immune.

In modelli preclinici animali e nell'uomo il cotrapianto di MSCs e cellule staminali emopoietiche (HSCs) ha dimostrato di ridurre l'incidenza e la severità della GvHD e di migliorare i tempi di attecchimento granulocitario e/o piastrinico dopo trapianto allogenico. La GvHD rappresenta una condizione patologica ad elevatissima incidenza (90%) e mortalità (20%) in pazienti allo-trapiantati. Nel 2004 il gruppo di K. Leblanc di Stoccolma ha pubblicato uno studio in cui dimostrava che le cellule MSC espanse in vitro erano in grado di ridurre e talora di abolire le manifestazioni cliniche della GvHD (lesioni cutanee, danno epatico ed intestinale) in pazienti sottoposti a trapianto allogenico con malattia GvHD di grado severo (III e IV) non responsiva alle terapie convenzionali. In questi ultimi anni sono stati riportati diversi altri casi di GvHD trattati con MSC espanse ex-vivo con risultati non sempre migliorativi del quadro clinico<sup>152</sup>. In questo settore di ricerca clinica rimane da definire quale è il numero ottimale di MSCs impiegabili per la terapia della GvHD, la modalità di espansione ed il numero di passaggi in vitro necessari, la possibilità di impiegare cellule MSCs criopreservate, le modalità di somministrazione (infusioni singole o multiple) e le loro capacità immunomodulatorie in relazione ai fattori sopramenzionati<sup>153</sup>.

Tuttavia in studi più recenti di co-trapianto MSCs e HSCs è stato evidenziato un aumento di incidenza di recidive di malattia e di incidenza di seconde neoplasie, dopo allo-trapianto in verosimile diretta correlazione allo stato di immuno-tolleranza indotta dall'infusione sistemica e locale di MSCs. L'associazione tra co-trapianto di MSCs e sviluppo di neoplasie potrebbe dipendere dalla capacità funzionale delle molecole HLA-G di contrastare la GvHD ma nel contempo di permettere la riacutizzazione della malattia. Queste considerazioni aumentano ulteriormente la necessità di determinare "a priori" l'attività immunomodulatoria delle MSCs e la produzione di sHLA-G potrebbe essere un buon marcatore biologico per tale valutazione.

Un'altra interessante applicazione clinica delle MSCs risiede nella loro capacità di migliorare il processo di attecchimento e di ridurre l'incidenza di rigetto di organi e tessuti eterologhi trapiantati in modelli animali e occasionalmente nell'uomo<sup>152</sup>. In modelli preclinici di studio, le MSCs infuse per via sistemica determinano una sorta di blocco o "congelamento" delle attività funzionali delle cellule effettrici del sistema immunitario dell'ospite, e un rallentamento delle loro capacità mitotiche così da indurre tolleranza immunitaria e mancata risposta a stimoli antigenici. In questo contesto ulteriori attività biologiche delle MSCs possono essere chiamate in causa, in primis una loro capacità di transdifferenziare ("plasticità" differenziativa), ed in seconda istanza la capacità di rilasciare citochine ad azione anti-infiammatoria, e di molecole anti-apoptotiche e/o "trofiche" in grado di promuovere la riparazione di tessuti danneggiati e la protezione dei tessuti eterologhi trapiantati<sup>152</sup>.

Per quanto attiene l'impiego clinico delle MSCs nell'uomo in contesti di immunomodulazione, è bene sottolineare che le evidenze cliniche fino ad ora osservate in studi di fase I e II non permettono di trarre conclusioni definitive, e si rimane dunque in attesa di verificare i risultati di studi clinici randomizzati. Esiste inoltre la necessità di determinare

l'attività immunomodulatoria delle MSCs a priori del trapianto, e si è in cerca di marcatori biologici per tale valutazione.

## **1.7 - MSC e malattie infiammatorie croniche intestinali**

### **1.7.1 – Cellule staminali intestinali**

La maggior parte dei tipi cellulari dell'epitelio intestinale viene costantemente eliminata con le feci e deve essere sostituita da una abbondante quantità di cellule generata ex novo da staminali multipotenti ad elevata frequenza di divisione. Queste cellule staminali sono localizzate nell'area profonda delle cripte e la proliferazione avviene nel terzo inferiore delle cripte. Dalla zona di proliferazione le cellule si portano alla area di maturazione, in direzione apicale, dove vanno incontro a differenziazione strutturale ed enzimatica. Sull'apice le cellule, terminalmente differenziate, vengono perse e sostituite. Il rinnovamento cellulare avviene in soli 3-6 giorni. La cinetica delle cellule stromali che formano lo strato trofico per l'epitelio non è ancora chiarita. Inoltre non sono stati ad oggi individuati veri e propri marker per le cellule staminali dei tessuti intestinali e non si conosce una tecnica per l'isolamento e l'espansione *in vitro*. Lo sviluppo di metodi di coltivazione *in vitro* potrebbe permettere la caratterizzazione dettagliata e la manipolazione sperimentale delle cellule staminali<sup>111</sup>.

### **1.7.2 – Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)**

La patogenesi del morbo di Crohn e della Colite Ulcerosa, le due principali forme di malattie infiammatorie croniche intestinali (Inflammatory Bowel Diseases, IBD), coinvolge una rete complessa di interazioni tra fattori genetici, ambientali, immunologici e cellulari<sup>112</sup>. Si tratta di due malattie infiammatorie croniche, recidivanti, idiopatiche, con quadro patologico di abnorme immunoreattività dell'ospite. L'eziologia di queste patologie altamente debilitanti rimane ancora in gran parte oscura. L'ipotesi emergente tratteggia un sistema infiammatorio intestinale che verrebbe in prima battuta stimolato, e che poi subirebbe un processo di retro-regolazione, de-regolazione, dovuto ad un deficit o ad una sovraespressione di molecole implicate nel controllo della funzione immunitaria. Infatti ad oggi la maggior parte degli agenti terapeutici utilizzati in pratica clinica con discreta efficacia sono farmaci immunosoppressori (corticosteroidi nella maggior parte dei casi). Le IBD colpiscono prevalentemente individui di sesso maschile a qualunque età. Il morbo di Crohn può colpire qualunque porzione del tratto gastrointestinale con tipico interessamento trasmurale della parete intestinale e localizzazione segmentaria, ovvero con distribuzione a salto - a confini netti, di un processo infiammatorio caratterizzato da esacerbazioni acute, granulomi e fistole. La Colite Ulcerosa è una malattia infiammatoria limitata al colon, interessa solo mucosa e sottomucosa e si estende prossimalmente in modo continuo a partire dal retto sino, nei casi più gravi, a tutta la mucosa colica (pancolite). E' caratterizzata da atrofia della mucosa ed ulcerazioni. Il quadro

patologico in entrambe le affezioni è infiammatorio, soprattutto a livello delle cripte intestinali (ascessi criptici), con fibrosi e stenosi. La colite ulcerosa si distingue per il rischio di sviluppare Megacolon Tossico, ovvero una dilatazione del colon che diventa gangrenoso in seguito ad abolizione della funzione neuromuscolare, e di sviluppare displasia e cancerizzazione. I trattamenti a lungo termine con corticosteroidi o altri farmaci immunosoppressori sono frequentemente associati ad effetti collaterali. Una considerevole porzione di pazienti, inoltre, diventa refrattaria al trattamento con steroidi e riceverà durante il corso della malattia uno o più trattamenti chirurgici di colectomia.

L'analisi dettagliata di modelli animali geneticamente ingegnerizzati ha suggerito che una de-regolazione della risposta immunitaria guidata dalla microflora luminale sia di cruciale importanza nell'innescare e nel sostenere il processo patofisiologico<sup>108,109</sup>. L'analisi molecolare e cellulare delle risposte immunitarie ha permesso la comprensione della funzione biologica di cellule immunitarie intestinali e la definizione di pathway metabolici con ruolo chiave nell'infiammazione, potenziali nuovi target terapeutici.

Nell'intestino sano il sistema immunitario mucosale è caratterizzato da interazioni dinamiche strettamente regolate per garantire il mantenimento di un appropriato riconoscimento e bilanciamento tra l'ospite e la microflora luminale simbiotica. Queste interazioni risiedono eminentemente nella comunicazione tra cellula immunitaria e cellula immunitaria e tra cellule immunitarie e cellule coinvolte nella integrità della mucosa (cellule epiteliali, miofibroblasti sottomucosali, cellule mesenchimali dello stroma, cellule endoteliali della microvascolatura). La comunicazione tra queste cellule può avvenire attraverso un contatto diretto cellula-cellula tramite recettori di superficie, attraverso il rilascio e la cattura di mediatori solubili o ancora attraverso mediatori costituenti la matrice extracellulare. Nell'intestino dei pazienti con IBD compare e si protrae uno sbilanciamento tra citochine regolatorie ed infiammatorie, il che condurrebbe ai danni tissutali visibili a livello mucosale e nello stroma sottostante.

Studi recenti hanno portato forti evidenze sul fatto che la Colite Ulcerosa sia caratterizzata da una risposta immunitaria di tipo Th1. E' stato suggerito che l'anormale reattività ad antigeni luminali o mucosali potrebbe essere il risultato di uno sbilanciamento tra l'azione di linfociti CD4+ proinfiammatori e regolatori e citochine infiammatorie associate alla polarizzazione Th1.

Esiste una predisposizione genetica a sviluppare IBD, anche se non si tratta di una ereditarietà mendeliana né di una predisposizione patologia-specifica. Si tratta di malattie poligeniche con ampia eterogeneità genetica e scarsa penetranza. Gli avanzamenti nella conoscenza della genetica delle IBD hanno permesso l'individuazione di loci associati alle patologie e le mutazioni di suscettibilità fino ad ora individuate con analisi di linkage colpiscono proprio geni dell'immunità: locus MHC II, geni per citochine (proinfiammatorie: TNF-alfa, IFN-gamma, IL-12, IL-18; antiinfiammatorie: IL-10, TGF-beta), Nod2/CARD15. La proteina NOD2/CARD15 è coinvolta nel riconoscimento di prodotti batterici (TLRs) ed è in grado di attivare una risposta infiammatoria (CARD2 – NF-kB) o indurre il processo apoptotico (CARD1 – TNFR). Sono state individuate mutazioni che determinano la sintesi di una proteina tronca con alterata

funzionalità, che porta ad una iperproduzione di citochine proinfiammatorie.

I processi infiammatori cronici portano alla distruzione della barriera epiteliale e alla formazione di ulcerazioni dell'epitelio. La risoluzione dell'attività infiammatoria è associata con processi di riparo che facilitano il rimodellamento tissutale per ripristinare la normale architettura intestinale. I processi di riparo nei pazienti con colite ulcerosa sono spesso in grado di rigenerare la normale architettura mucosale, ma nei pazienti con Crohn spesso si assiste alla formazione di ostruzioni associate ad una eccessiva fibrosi. La fibrosi è una delle principali complicazioni nelle IBD, tipicamente associata con iperplasia delle cellule mesenchimali, disorganizzazione tissutale e deposizione di collagene fibrillare<sup>113</sup>. L'apparire transiente di cellule mesenchimali è una caratteristica della normale riparazione delle ulcere, ma la persistenza di queste cellule è associata ad una eccessiva deposizione di collagene e fibrosi. L'isolamento e la caratterizzazione di fibroblasti intestinali ha mostrato una maggiore attività proliferativa delle cellule derivanti da colon di pazienti IBD rispetto a quelle derivanti da colon sani. Inoltre la secrezione di collagene da parte di fibroblasti IBD è apparsa significativamente più intensa rispetto a fibroblasti normali. Questo suggerisce la presenza nella UC e nel CD di un subset di fibroblasti attivati, funzionalmente differenti rispetto a quelli di colon sani<sup>114,115</sup>. Studi recenti suggeriscono che le cellule mesenchimali derivate dalle staminali di midollo osseo abbiano un ruolo importante nei processi di riparo intestinale e di fibrosi<sup>114</sup>.

### **1.7.3 - Miofibroblasti subepiteliali (SEMF) e riparo**

I miofibroblasti subepiteliali (SEMFs) sono localizzati immediatamente al di sotto della membrana basale nella normale mucosa intestinale, giustapposti alla base delle cellule epiteliali. Queste cellule sono cellule mesenchimali specializzate che esibiscono un fenotipo ultrastrutturale di tipo contemporaneamente fibroblastico e muscolare liscio, sono caratterizzate da una positiva immunoreattività per alfa-smooth muscle actin (alfa-SMA) e vimentina e negativa immunoreattività per desmina<sup>116,117</sup>. Le SEMFs si distinguono dalle cellule muscolari lisce poichè queste ultime esprimono alfa-SMA ma non vimentina. La localizzazione delle SEMFs al di sotto della membrana basale suggerisce che queste cellule abbiano un ruolo nella regolazione di funzioni delle cellule epiteliali come la proliferazione, il differenziamento ed il metabolismo della matrice extracellulare, con un effetto sulla crescita della membrana basale. Le SEMFs intestinali sono classificate come membri di una famiglia di cellule funzionalmente correlate che includono le cellule epatiche di Ito, le cellule glomerulari mesangiali ed i fibroblasti dell'orbita e della sinovia. La letteratura descrive le SEMFs come un sincizio che si estende attraverso la lamina propria intestinale e si fonde con i periciti che circondano i vasi sanguigni<sup>118</sup>. Nella regione delle cripte le SEMFs sono ovali o scafoidi e si sovrappongono a dare una sorta di tegolato. Sono unite da giunzioni comunicanti ed aderenti. Nella regione superiore delle cripte e nei villi dell'intestino tenue le SEMFs assumono una morfologia stellata<sup>118</sup>.

Il processo di riparo dell'epitelio intestinale è mediato da due meccanismi separati<sup>119</sup>. Il primo processo è chiamato restituzione, una importante risposta a danni minori o moderati. Se la membrana basale al di sotto dell'epitelio rimosso rimane intatta, le cellule epiteliali residue sul perimetro della de-epitelizzazione si muovono lungo la membrana basale e ricoprono l'area denudata. Questo processo è promosso e controllato da fattori di crescita derivati dalle SEMFs (TGF-beta, EGF, aFGF e bFGF e citochine dell'infiammazione). Il secondo processo si osserva quando la ferita è profonda e viene richiesta la ricostruzione di tessuti subepiteliali. In questo processo le cellule mesenchimali producono una nuova membrana basale su cui solo in seguito le cellule epiteliali potranno proliferare e migrare. Il rimodellamento della matrice extracellulare (metalloproteasi), la secrezione di polimeri della matrice, nonché dei fattori di crescita ad opera delle SEMFs in questo processo rigenerativo sono eventi coordinati<sup>120</sup>. Il mantenimento e la ricostituzione della membrana basale sono processi chiave nel riparo della mucosa; le SEMFs giocano un ruolo importante in questi processi attraverso la propria crescita, la secrezione di fattori di crescita e di matrice extracellulare<sup>121</sup>.

Nella mucosa IBD si osserva un aumento nel numero di cellule alfa-SMA positive rispetto alla mucosa sana<sup>113,114,122</sup>. L'aumento di cellule alfa-SMA positive è notevole ai margini delle profonde ulcerazioni nei pazienti con colite ulcerosa e si osserva un aumento anche ai margini della mucosa infiammata dei pazienti con Crohn. Mahida et al.<sup>116</sup> hanno riportato un metodo per isolare popolazioni pure di SEMFs dalla mucosa di colon umano: esse mantengono il loro fenotipo (alfa-SMA+, vimentina+, fibronectina+, collagene IV+, laminina+) in coltura per alcuni passaggi. McKaig et al.<sup>115</sup> hanno dimostrato che la proliferazione delle SEMFs isolate da colon di pazienti Crohn è significativamente maggiore rispetto a quella delle SEMFs isolate da colon sani o con colite ulcerosa. Nelle SEMFs isolate il trattamento con PDGF-BB, bFGF e IGF-1 stimola in maniera significativa la proliferazione, valutata mediante il saggio di incorporazione di timidina triziata. L'aumento nelle risposte di proliferazione delle SEMFs e la secrezione di fattori di crescita potrebbe contribuire ai cambiamenti fibrotici nei pazienti con IBD. L'iperplasia delle cellule delle cripte che si osserva nella mucosa infiammata è mediata dal Keratinocyte Growth Factor (KGF) derivato dalle SEMFs in risposta alla stimolazione con TNF-alfa<sup>123</sup> (citochina proinfiammatoria, la concentrazione aumenta nella mucosa infiammata).

Le SEMFs, sotto gli stimoli di fattori di crescita e citochine dell'infiammazione, controllano anche la composizione della matrice extracellulare che secernono costitutivamente. Le metalloproteasi della matrice (MMPs) appartengono al principale gruppo di enzimi in grado di degradare la matrice extracellulare ed i componenti della membrana basale. MMP-1 è una collagenasi intersiziale che degrada il collagene di tipo I, II e III, MMP-2 (gelatinasi-A) degrada il collagene non fibrillare di tipo IV e V, MMP-3 (stromielisina-1) è in grado di degradare i proteoglicani, la laminina, fibronectina ed il collagene non fibrillare. L'attività delle metalloproteasi è controllata da specifici inibitori tissutali (TIMPs) ed inibitori non specifici come Beta2-macroglobulina. Un bilanciamento finemente regolato tra MMPs e TIMPs controlla il tasso di turnover della ECM nelle normali condizioni fisiologiche e nel



rimodellamento tissutale durante l'infiammazione e la rimarginazione delle ferite. E' stato dimostrato che l'espressione di MMPs e TIMPs è elevata nella mucosa infiammata dei pazienti IBD<sup>124</sup>. MMP-2 e TIMP2 sono basalmente secreti in abbondanza. L'espressione di MMP-1, MMP-3 e TIMP-1 aumenta notevolmente in risposta alla stimolazione con IL-1Beta, TNF-alfa ed FGF-2 (bFGF), più moderatamente in seguito alla stimolazione con TGF-Beta, PDGF-BB, KGF, IGF-1 ed EGF. IL-17, prodotta dai linfociti T attivati, è in grado di stimolare la secrezione di MMP-3.

#### **1.7.4 – Effetti trofici delle SEMF**

Lo sviluppo della mucosa intestinale ha luogo mediante due processi: 1) morfogenesi, durante la quale avvengono interazioni tra l'endoderma embrionale ed il mesenchima per formare le varie porzioni del canale digestivo intestinale sino alla struttura a villi ed a cripte e 2) differenziamento dalla cripta delle cellule staminali epiteliali in quattro tipi cellulari intestinali (enterociti, cellule goblet caliciformi, cellule enteroendocrine e cellule di Paneth)<sup>117</sup>. Per determinare le interazioni tra le SEMFs e le cellule epiteliali, cellule della linea T84 sono state co-coltivate su un feeder-layer confluyente di SEMFs. Normalmente le cellule T84 proliferano come un semplice monostrato, ma in seguito a questa co-cultura formano aggregati compatti e rotondeggianti con piccoli lumi. Al microscopio elettronico a trasmissione si osserva la formazione di una architettura luminale con differenziamento verso il fenotipo enterocitico che include l'organizzazione di microvilli apicali ben formati. Questo differenziamento morfologico viene bloccato dalla cocoltura in transwell in cui il contatto cellula-cellula è prevenuto. Utilizzando cellule della linea Caco-2 è stata dimostrata l'importanza del prodotto del gene epimorfina per la formazione dell'architettura luminale<sup>125</sup>. Epimorfina è un membro della famiglia delle syntaxine, proteine del docking vescicolare: si tratta di una proteina associata alla membrana che regola la morfogenesi epiteliale in vari tessuti. Epimorfina è ampiamente espressa nelle cellule stromali/pericitiche adiacenti o cingenti i vasi sanguigni nonché in vari epiteli ed anche tessuti muscolari dell'uomo e del topo: promuove la formazione di strutture luminali, duttulari o ramificate durante l'ontogenesi. Fattori di crescita come HGF ed EGF richiedono la presenza di epimorfina per raggiungere una efficace morfogenesi. Nel colon l'epimorfina è osservabile nelle cellule alfa-SMA positive. Numerosi fattori di crescita e dell'infiammazione (IL-1beta, TNF-alfa, TGF-beta, PDGF, FGF-2 o EGF) sono in grado di potenziare la produzione di HGF. L'HGF derivato dalle SEMFs è considerato essere necessario per la proliferazione dell'epitelio intestinale, dunque l'epimorfina è un potenziale candidato ad essere il fattore mesenchimale che media la ricostruzione epiteliale nel processo di riparo mucosale<sup>125</sup>. Si ritiene che le cellule staminali in diversi tessuti risiedano in "nicchie" formate da un nido di cellule e dalla loro matrice extracellulare, che provvedono al mantenimento di un microambiente ottimale per la funzione delle cellule staminali. All'interno della nicchia una cellula staminale persa può essere sostituita dalla divisione simmetrica di altre

cellule staminali. Le nicchie possono inoltre essere colonizzate dopo il trapianto di cellule staminali isolate o dopo la migrazione di cellule da altre nicchie. La capacità delle nicchie di modulare dinamicamente il comportamento cellulare suggerisce che potrebbero avere un ruolo importante nel transdifferenziamento e nei disordini proliferativi. Le SEMFs, sottostanti la membrana basale e le cellule epiteliali, sembrano influenzare la proliferazione delle cellule epiteliali e la rigenerazione mediante un cross-talk epitelio-mesenchimale, e potrebbero in definitiva determinare il destino delle cellule epiteliali. E' stato dimostrato che le sorgenti della segnalazione Wnt (che attraverso il recettore Fzd attiva una cascata che porta alla espressione nel fondo delle cripte intestinali di beta-Catenina/T cell factor, dunque alla proliferazione e alla formazione di cripte e villi) sono le SEMFs, il che è coerente con l'ipotesi del ruolo di queste cellule nel mantenimento della nicchia staminale<sup>126</sup>. L'espressione del recettore Fzd anche nelle SEMFs suggerisce che le proteine Wnt secrete possono agire non solo in maniera paracrina ma anche autocrina.

Le cellule epiteliali e mesenchimali dialogano a livello mucosale attraverso messaggi paracrini ed autocrini (TGF-beta, PDGF) per controllare mutualmente il differenziamento e la produzione di componenti della matrice extracellulare. L'interazione tra cellule stromali e cellule di tipo staminale epiteliale (studi di cocoltura con le linee epiteliali Caco- ed, HT-29) porta ad un aumento del rilascio e dunque della concentrazione di TGF-beta e PDGF nel microambiente, che stimola i fibroblasti a differenziare in senso miofibroblastico (alfa-SMA+, tenascina++, aumento nella deposizione di condroitin solfato e versicano) e le cellule di tipo staminale epiteliale a differenziare in senso epiteliale a dare strutture ghiandolari con lumi<sup>135</sup>.

### **1.7.5 – SEMF ed immunomodulazione**

Le funzioni immunitarie sembrano essere molto importanti nella patogenesi delle IBD. In molti tessuti le risposte immunitarie sono regolate in associazione stretta al metabolismo della matrice extracellulare. Per fare un esempio, nelle SEMFs di colon si può osservare una induzione accoppiata delle chemochine (IL-8 e proteina di chemoattrazione dei monociti-1, MCP-1) e delle metalloproteasi MMPs in risposta ad IL-1beta e TNF-alfa<sup>127</sup>. E' stato scoperto che nella mucosa infiammata dei pazienti IBD aumentano le cellule esprimenti IL-17 (Linfociti T principalmente di memoria CD45 RO+). Nelle SEMFs IL-17 stimola la secrezione di IL-6, IL-8, MMP-3 ed MCP-1 attraverso le vie di kinasi NF-kB e MAP. Le SEMFs rilasciano G-CSF, GM-CSF ed M-CSF in risposta a IL-1beta e TNF-alfa, il rilascio è potenziato da IL-17 (che regola dunque diverse funzioni immunologiche delle SEMFs). Per quanto riguarda l'avvio della risposta immunitaria innata, le SEMFs sono in grado di riconoscere il lipopolisaccaride (LPS) grazie ai recettori Toll-like (TLR): in sinergia con IL-17 viene indotta la sintesi di COX-2 e di prostaglandine<sup>128</sup>. Anche IL-22, il cui recettore è espresso nelle SEMFs, è in grado di attivare geni per proteine dell'infiammazione. In risposta ad IL-22, IL-1beta e TGF-beta le SEMFs esprimono IL-11 che è in grado di prevenire lo sviluppo o migliorare uno stato di infiammazione intestinale

acuta o cronica in modelli animali. Appare dunque evidente il coinvolgimento delle SEMFs nella modulazione della risposta infiammatoria ed immunitaria a livello della mucosa e della sottomucosa intestinale.

### **1.7.6– Cellule Staminali da midollo osseo e IBD**

Il possibile contributo delle cellule staminali di midollo osseo alla mucosa intestinale è stato esaminato per molti anni. Questa possibilità fu inizialmente negata da Cheng e Leblond sulla base di un modello di trasfusione di midollo osseo marcato con timidina triziata, poi da Cairnie che ha utilizzato un marcatore genetico. Cheng e Leblond proposero la teoria “unitaria”, poi ampiamente accettata, secondo la quale tutte le cellule differenziate di mucosa e sottomucosa deriverebbero da staminali residenti<sup>129</sup>. Molti studi, però, hanno riportato che le cellule di midollo osseo potrebbero ripopolare sia il lineage mesenchimale che quello epiteliale dell'intestino. Okamoto et al<sup>130</sup> hanno affermato che cellule di midollo osseo possono contribuire all'epitelio gastrico ed intestinale, Korbiling et al<sup>131</sup> hanno riportato che cellule derivanti da donatore si integrano nell'epitelio gastrico dopo trapianto di cellule staminali mobilitate in sangue periferico. Krause et al<sup>38</sup> hanno dimostrato inoltre che una singola cellula staminale derivata da midollo osseo può attecchire e dare progenie che costituisce l'epitelio intestinale nel topo. Uno dei lavori più convincenti<sup>130</sup> riporta il caso di un paziente con graft-versus-host disease osservato a tempi diversi: nella fase di risoluzione fu osservato un aumento di 10-15 volte di cellule derivanti da midollo osseo attecchite nell'intestino. Tra i pazienti trapiantati con midollo osseo si è osservato un aumento di 40 o 50 volte di cellule derivanti da donatore attecchite nell'epitelio in rigenerazione delle ulcere gastriche rispetto all'epitelio sano.

Studi sul contributo del trapianto di midollo osseo alle SEMFs hanno dato risultati molto interessanti. Sono stati analizzati i colon e gli intestini di topi femmine che hanno ricevuto trapianti di midollo osseo da donatori di sesso maschile e biopsie intestinali da pazienti femmine con graft-versus-host disease in seguito a trapianto da donatori maschio. Cellule derivanti da midollo osseo attecchivano frequentemente nell'intestino tenue e nel colon e differenziavano a formare SEMFs intestinali nella lamina propria<sup>132</sup>. L'ibridizzazione in situ ha confermato la presenza del cromosoma Y in queste cellule e il fenotipo immunoistochimico alfa SMA+, desmina-, marker macrofagico F4/80-, CD34-, nella lamina propria pericriptica giustifica il riconoscimento del differenziamento in SEMFs delle cellule derivanti da midollo osseo. L'attecchimento di cellule derivanti da midollo in tessuti ed organi è regolato da numerose citochine e segnali di stress. Utilizzando il modello della colite acuta indotta da trinitrobenzene sulfonato (TNBS) è stato mostrato un aumento nella contribuzione delle cellule di midollo osseo alle SEMFs di colon ed alla neovascolatura nelle aree di infiammazione rispetto alle aree adiacenti di mucosa normale<sup>133</sup>. I topi avevano ricevuto un trapianto di midollo osseo sex-mismatched e la colite era stata indotta 6 settimane dopo con iniezioni intracoloniche di TNBS. Quattordici giorni dopo l'iniezione non c'era più evidenza di colite e non c'era differenza

apprezzabile nel numero di cellule derivanti da midollo osseo tra zona e zona: questo è interessante, in quanto le cellule potrebbero abbandonare il colon una volta risolta la colite.

E' stato utilizzato anche il modello di colite cronica in topi knock-out per IL-10 per studiare l'attecchimento di cellule da midollo osseo ed il loro contributo alle SEMFs di colon nella mucosa infiammata<sup>132</sup>. Topi femmina IL-10<sup>-/-</sup> ricevevano trapianti di midollo sex-mismatched da topi IL-10<sup>-/-</sup> oppure da topi wild type. Il braccio che riceveva il trapianto da knockout IL-10<sup>-/-</sup> mostrava SEMFs di donatore (cromosoma Y positive) fino al 45% nelle aree infiammate ma la patologia infiammatoria proseguiva estensivamente. Il gruppo ricevente trapianto da wild type mostrava un miglioramento della colite, con aumento del peso corporeo e miglioramento degli indici istologici, ed approssimativamente il 30% delle SEMFs era di origine midollare. Il midollo osseo contribuisce dunque alle SEMFs sia in circostanze infiammatorie che in circostanze normali.

L'origine e la cinetica dei miofibroblasti devono in definitiva ancora essere comprese. Si crede che i miofibroblasti derivino da due sorgenti principali: il midollo osseo<sup>134</sup> ed i fibroblasti localmente attivati in risposta al TGF-beta, l'agente differenziante che indurrebbe i progenitori fibroblastici nel commissionamento miofibroblastico. Questi miofibroblasti circondano le cellule staminali epiteliali alla base delle cripte intestinali. I risultati degli studi di cinetica che hanno utilizzato marcatura con pulse di timidina triziata nel colon di conigli e nel digiuno di topi suggeriscono che i miofibroblasti, così come le cellule epiteliali, proliferino, migrino e differenzino terminalmente lungo l'asse cripta-superficie o cripta-villo grazie ad interazioni epitelio-mesenchimali.

E' stato evidenziato inoltre che le SEMFs controllano la risposta immunitaria e l'infiammazione a livello mucosale e sottomucosale: esplicano la loro funzione effettrice nella mucosa infiammata mediante l'esposizione di molecole segnalatorie e di attracco in membrana, la secrezione di citochine dell'infiammazione e di chemochine<sup>136</sup>. Queste scoperte potrebbero suggerire l'esistenza di differenze funzionali delle SEMFs intestinali e/o delle cellule staminali mesenchimali tra individui normali e pazienti IBD.

Una delle proprietà più interessanti che le MSC hanno evidenziato, infatti, è la loro capacità di modulare in senso soppressivo la risposta immunitaria a diversi livelli di linfociti, APC e NK. Auto- ed allo-trapianti di MSC non sono soggetti a rigetto.

E' stato mostrato che le MSC interagiscono con numerosi tipi cellulari del sistema immunitario inibendo la produzione di citochine proinfiammatorie quali TNF-alfa e IFN-gamma, favorendo il rilascio di IL-10 e TGF-beta e rilasciando prostaglandina E2.

La capacità delle MSC di mediare la soppressione della proliferazione dei linfociti T è stata dimostrata in numerosi studi. Il gruppo di Di Nicola<sup>140</sup> e quello di Tse<sup>141</sup> hanno dimostrato che le MSC sono in grado di secernere citochine immunosoppressive quali IL-10 e TGF-beta. Nello stato proinfiammatorio di una mucosa IBD potrebbe giocare un ruolo chiave la diminuzione della concentrazione o la mancata azione della citochina TGF-beta, deputata all'immunosoppressione, ma anche al controllo del corretto differenziamento dell'epitelio mucosale e dello stroma sottomucosale.

Trial clinici di fase II e III stanno valutando le MSC derivate da tessuto osseo e tessuto adiposo nel trattamento delle manifestazioni delle IBD. La nostra ipotesi è che esistano cellule simili alle MSC, imparentate con le SEMF, residenti nei tessuti intestinali mucosali e sottomucosali. Abbiamo dunque indagato i tessuti intestinali come sorgenti di staminali simili alle MSC, con particolare interesse rispetto alle caratteristiche trofiche ed immunomodulatorie di queste cellule.

## 1.8 – MSC e Diabete

### 1.8.1 - *Pancreas endocrino: Isole di Langerhans*

Il pancreas è una ghiandola annessa all'apparato digerente ed è composta da tre zone: pancreas esocrino (costituito da ghiandole secernenti gli enzimi digestivi che vengono riversati nel duodeno), pancreas endocrino (l'insieme delle isole del Langerhans) e dai dotti pancreatici. Ci sono circa un milione di isole che in massa equivalgono a 1/31 del pancreas e sono più abbondanti nella coda della ghiandola. Sono avvolte da fibre connettivali che formano poi una sottile trama reticolare, contenente capillari fenestrati, che sostiene le cellule secernenti. Ogni isola del Langerhans contiene almeno 4 tipi di cellule producenti ormoni: cellule  $\alpha$ , producono glucagone; cellule  $\beta$ , producono insulina; cellule  $\delta$ , producono somatostatina, cellule PP, producono polipeptide pancreatico e cellule  $\epsilon$ , producono grelina<sup>154</sup>. Questi tipi cellulari non sono disposti casualmente ma hanno un'organizzazione precisa: le cellule  $\beta$  sono all'interno, circondate da tutti gli altri tipi, in modo tale da risentire l'influenza di tutte le variazioni ormonali. All'interno di ognuna è presente una ricca rete vascolare che permette di ottenere una perfusione di  $O_2$  10 volte maggiore rispetto al circostante tessuto esocrino<sup>155</sup>. Nelle isole terminano anche neuroni simpatici e parasimpatici evidenziando l'importante funzione di queste strutture nel controllo del metabolismo.

Il ruolo svolto dalle  $\beta$ -cellule delle isole è la secrezione di insulina in risposta all'aumento della concentrazione dei nutrienti in circolo, come il glucosio (la concentrazione fisiologica è 5mM, una concentrazione di 7-10 mM stimola una risposta), gli acidi grassi e gli amminoacidi<sup>156</sup>. Durante un pasto la condizione di normoglicemia è mantenuta grazie all'attività dell'insulina la quale provoca l'uptake dei nutrienti dal circolo sanguigno in muscolo, fegato e tessuto adiposo. Un calo o la totale assenza della produzione di insulina è caratteristica dei soggetti diabetici e ciò porta in primis alla perdita del controllo della glicemia, successivamente ad un quadro sindromico grave.

Quando aumenta la glicemia, il glucosio passa dal plasma all'interstizio per via dei capillari fenestrati e da qui, attraverso il trasportatore GLUT2, alle cellule  $\beta$ . All'ingresso di glucosio consegue una sintesi di ATP, che porta ad una depolarizzazione nelle cellule  $\beta$  ed all'apertura di canali del calcio: questo evento stimola la fusione dei granuli contenenti insulina con la membrana plasmatica e porta alla liberazione in circolo del contenuto.

L'insulina lega sulle cellule bersaglio un recettore tirosin-chinasico che, autofosforilandosi, attiva l'AMPciclico. Quest'ultimo attiva una proteina chinasi che fosforila, attivandoli, gli enzimi metabolici. Oltre a regolare la glicemia, l'insulina svolge molte altre funzioni di tipo anabolico e anti-cataboliche e permissive:

- Promuove la sintesi di acidi grassi e trigliceridi nel fegato e tessuto adiposo.
- Stimola la sintesi di glicogeno nel fegato e nel muscolo scheletrico.
- Permette l'entrata degli amminoacidi e promuove la sintesi proteica nella maggior parte dei tessuti.
- Inibisce la demolizione delle riserve energetiche in tutti i tessuti e sopprime la gluconeogenesi epatica.
- Deve essere presente nel sangue affinché l'ormone della crescita possa svolgere le sue funzioni. Ciò è dovuto in parte al ruolo dell'insulina nel promuovere la sintesi proteica, la sintesi del DNA e la divisione cellulare, tutti processi essenziali per la crescita dei tessuti.

### **1.8.2 - Diabete mellito**

Il diabete mellito è una patologia con una prevalenza (frequenza dei casi esistenti) mondiale di 171 milioni di casi negli adulti ed è associato ad un'alta percentuale di morbidità e mortalità<sup>157</sup>. A lungo termine può condurre a gravi complicazioni quali disordini cardiovascolari (restringimento delle arterie, infarti, patologie coronariche), patologie renali, danni al tessuto nervoso e cecità. La patologia origina da una distruzione selettiva delle cellule  $\beta$  pancreatiche portando ad una persistente iperglicemia<sup>158</sup>.

Il diabete tipo I o giovanile è conseguenza di un attacco autoimmune alle cellule  $\beta$ . Rappresenta il 10% dei casi totali di diabete a livello mondiale ma la sua incidenza (41/100000 persone/anno in Europa e 25/100000 persone/anno in Nord America) sta aumentando e costituisce uno dei principali problemi di sanitari<sup>159</sup>. Ancora oggi le cause che portano all'attivazione del sistema immunitario non sono totalmente chiarite. Le fasi principali nella patogenesi sono due:

1. Insulite: stato infiammatorio in cui le isole vengono infiltrate dai linfociti T e ciò avviene solo se sono presenti le cellule  $\beta$  (ciò indica che l'insulite riguarda solo questo tipo cellulare).
2. Distruzione delle cellule  $\beta$  e conseguente perdita di insulina.

Il diabete I è una patologia poligenica ma i fattori ambientali sono estremamente importanti: ad esempio, una popolazione a basso rischio di sviluppo del diabete diventa ad alto rischio se si trasferisce in una zona ad alto rischio; la variazione del clima influenza l'incidenza; esistono differenze di incidenza in popolazioni geneticamente comparabili.

I tre principali antigeni verso cui si sviluppa una reazione immune sono: GAD65 - proteina espressa nelle cellule neuroendocrine, incluse quelle di pancreas. Il 60-80% dei diabetici tipo I ha autoanticorpi rivolti verso GAD65.

ICA512 - membro della famiglia di proteine-tirosina fosfatasi transmembrana; ha un ruolo nella secrezione di insulina. Il 60-70% dei diabetici ha autoanticorpi verso ICA512.

INSULINA -gli autoanticorpi sono rivolti alla catena  $\beta$  e sono maggiori negli individui giovani.

La diagnosi di diabete tipo I può essere effettuata tramite la ricerca di questi autoanticorpi che appaiono mesi o anni prima l'insorgere della patologia indicando che non si tratta di una malattia acuta ma cronica. Si è dimostrato però che la presenza dei linfociti B non è necessaria per lo sviluppo del diabete I.

La distruzione selettiva delle isole è causata da meccanismi indiretti e diretti. Meccanismi indiretti: Linfociti CD4+ leganti l'MHC II sulle cellule dendritiche possono riconoscere autoantigeni, venire attivati a produrre citochine pro infiammatorie come IL-1, IL-6, IL10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sino a scatenare l'aggressione contro le cellule  $\beta$ . Meccanismi diretti: linfociti T CD8+ legano l'MHC I delle cellule  $\beta$  attivandone meccanismi apoptotici. Lo studio di modelli animali ha permesso di elucidare in parte la sequenza degli eventi: le prime cellule infiltranti sono le APC seguite dalle cellule T.

Il diabete tipo II è invece un disordine metabolico caratterizzato da iperglicemia dovuta ad insulino-resistenza. È la condizione diabetica più frequente (90-95%) tipica dell'età adulta. L'insulino-resistenza è legata a vari fattori: obesità, età, stile di vita sedentario, predisposizione genetica. Può insorgere per un' alterata trasduzione del segnale da parte dell'insulina o può essere dovuta a mutazioni del recettore stesso o dei trasportatori di glucosio. Vi è un probabile rapporto di causa-effetto tra eccesso di tessuto adiposo viscerale e uno stato di insulino-resistenza: questo tessuto infatti rilascia determinate citochine pro-infiammatorie, come il TNF $\alpha$  che blocca il recettore dell'insulina, implicate nella patogenesi dell'insulino-resistenza. Alla genesi dell'iperglicemia (dipendente dall'insulino-resistenza) si ha: aumento della liberazione di glucosio in circolo da parte del fegato, calo della captazione del glucosio da parte dei tessuti periferici per ridotta quantità/attività di GLUT4, aumento della lipolisi da parte del tessuto adiposo e del fegato. Nei primi periodi le cellule  $\beta$  compensano l'insulino-resistenza (quindi l'iperglicemia) aumentando la produzione di insulina ma, a lungo andare, perdono la responsività più e si deteriorano portando ad una perdita dell'omeostasi del glucosio. Inoltre la cronica iperglicemia sembra essere in grado di determinare o aggravare l'insulino-resistenza e il difetto delle cellule  $\beta$ . Quest ultimo sembra essere un requisito indispensabile per lo sviluppo del diabete e si identifica con un'insulinopenia assoluta (al di sotto dei valori normali) nei soggetti normopeso e con un'insulinopenia relativa (insuline mia normale-alta ma non sufficiente a compensare l'insulino-resistenza) nei soggetti obesi. Molti studi, invece, considerano l'iperinsulinemia l'evento scatenante dell'insulino-resistenza. La contraddizione è dovuta al fatto che entrambi gli eventi insorgono velocemente e sono necessari per mantenere l'omeostasi del glucosio necessario per la funzionalità cerebrale. In ogni caso l'evento finale è una perdita di cellule  $\beta$  ed una condizione di ipoinsulinemia associata a iperglicemia. (9-11)

I danni tissutali dovuti ad iperglicemia riguardano solo le cellule che non possono impedire l'entrata del glucosio nel compartimento intracellulare, non riuscendone in tal modo a mantenere una concentrazione costante. Le cellule in questione sono le endoteliali dei capillari, le mesangiali del rene, i neuroni e di Shwann nei nervi periferici.

Il determinante di maggior rilievo nelle complicazioni macrovascolari non è l'iperglicemia ma l'insulino-resistenza. Una delle conseguenze di questa condizione è la liberazione dagli adipociti di acidi grassi liberi (FFA) nelle cellule endoteliali delle arterie. In queste cellule (ma non in quelle microvascolari) l'aumentato flusso degli FFA risulta in una loro aumentata ossidazione a livello mitocondriale. Questo genera un aumento degli stessi NADH e FADH<sub>2</sub> originati dall'ossidazione del glucosio e ciò causa un'overproduzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (12)

### **1.8.3 -Terapie farmacologiche e trapianto**

In pazienti affetti da diabete tipo II non esistono molte cure; è importante l'aspetto preventivo tramite una dieta ed uno stile di vita adeguati. Per i diabetici di tipo I le possibilità di cura sono più vaste e comprendono sia le terapie farmacologiche – basate su iniezioni di insulina, sia il trapianto d'organo o di isole.

I pazienti con diabete tipo I necessitano di infusioni giornaliere di insulina. Questa però non è una terapia risolutiva e, a lungo termine, può generare anche gravi effetti collaterali quali episodi ipoglicemici severi. Esistono numerosi tipi di insuline ricombinanti, sia umane che porcine, anche se quest'ultime sono meno utilizzate al giorno d'oggi per via delle reazioni immunitarie che posso generare.

L'insulina attualmente in commercio è biosintetica, da DNA ricombinante. Sono disponibili insuline a differente durata di azione : 1) azione rapida ( inizia ad agire mezz'ora dopo la somministrazione s.c. con un picco dopo 3 ore e poi rapidamente declina) ; 2) azione intermedia (ritardata con la protamina o con lo zinco) inizia ad agire dopo circa 2 ore e raggiunge il suo massimo effetto dopo 4-6 ore dalla sua somministrazione s.c. e poi tende a diminuire ; 3) azione prolungata ( grossi cristalli di insulina - zinco) il cui effetto si mantiene per circa 24 ore.

Per quanto riguarda il diabete tipo I, da un punto di vista fisiologico, il trapianto o la rigenerazione del tessuto pancreatico sembrano le scelte migliori perché permettono una ricostituzione dell'intera struttura endocrina ed una regolazione migliore. Fino ad oggi le possibilità di trapianto sono state il trapianto pancreas o di rene e pancreas e, più recentemente, il solo trapianto di isole.

Il trapianto più efficace è quello dell'intero pancreas: dopo 1 anno si mantiene in più dell'80% dei casi l'insulino-indipendenza. L'organo del ricevente si mantiene e spesso si esegue un trapianto contemporaneo pancreas-rene.

Il trapianto dell'intero organo è associato ad un'alta mortalità. La ricostruzione vascolare è infatti complessa e vi è un elevato rischio di trombosi. La terapia immunosoppressiva perpetua preclude il trapianto ai bambini.

L'interesse dei ricercatori e dei clinici si è dunque rivolto al trapianto della sola componente endocrina, ovvero le isole pancreatiche.

I primi esperimenti di trapianto di isole furono condotti negli anni sessanta dal pioniere Paul Lacy, il quale riuscì a normalizzare la glicemia in ratti diabetici. Nel 1999 James Shapiro eseguì per la prima volta un



trapianto di isole pancreatiche su sette pazienti con diabete di tipo I utilizzando un regime immunosoppressivo senza glucocorticoidi: ad un anno dal trapianto queste persone erano insulina-indipendenti<sup>160</sup>.

Le isole, le cui dimensioni vanno dai 70 ai 350  $\mu\text{m}$ , vengono trapiantate attraverso la circolazione venosa portale nel fegato, un organo altamente vascolarizzato. Il trapianto di isole possiede importanti vantaggi in confronto con il trapianto d'organo: è una metodica meno invasiva: è sufficiente una anestesia locale e l'ospedalizzazione è più breve.

#### **1.8.4 - Problematiche legate al trapianto**

Restano comunque importanti problematiche collegate con il trapianto. Il problema principale, sia di isole che di pancreas, è la carenza dei donatori: ogni anno sono disponibili circa 3000 pancreas in U.S. ma i nuovi casi di diabete tipo I, ogni anno, sono circa 35000.

Il trapianto dell'intero pancreas è una procedura chirurgica molto complessa ed invasiva, associato ad un elevato rischio di trombosi e ad un'alta mortalità.

Per quanto riguarda il trapianto delle isole pancreatiche, le procedure di isolamento e purificazione sono al momento insoddisfacenti e causano un'elevatissima perdita di tessuto endocrino a priori del trapianto. La procedura di infusione provoca un aumento della pressione portale proporzionale alla massa delle isole infuse; questo fattore limita la quantità totale delle isole che possono essere impiantate. Il trapianto di isole nel fegato è associato ad una reazione infiammatoria immediata sangue-mediata, trombosi e ischemia del tessuto epatico associate ad aumento di enzimi epatici. Durante l'attecchimento vengono perse circa il 50-75% delle isole preparate.

Il regime immunosoppressivo rappresenta un ulteriore problema poiché, a lungo andare, porta ad un aumento delle infezioni opportunistiche. Paradossalmente, inoltre, i farmaci immunosoppressori sono dannosi per le cellule  $\beta$ <sup>161</sup>.

Oltre alle reazioni immunitarie vi sono altri fattori che contribuiscono alla perdita delle isole nel periodo immediatamente successivo al trapianto tra cui: lo stato ipossico nella vena Porta, lo stato energetico delle isole e l'equilibrio tra mediatori pro-apoptotici e anti-apoptotici.

La ricopertura delle isole con cellule endoteliali, derivate ad esempio da aorta, potrebbe aiutare a prevenire il contatto col sangue, a prevenire la distruzione dell'isola, e a stimolare l'anastomosi vascolare e l'attecchimento.

Un ulteriore fattore è la dimensione delle isole. Un'isola è definita piccola se il suo diametro è compreso tra i 50 e 150  $\mu\text{m}$  e grande se è compreso tra 150 e 300  $\mu\text{m}$ . Durante il processo di isolamento *in vitro*, l'abbondante struttura capillare degenera e, subito dopo il trapianto, le isole possono ricevere ossigeno e nutrienti solo attraverso il processo di diffusione poiché la rivascolarizzazione prende avvio dopo 7-10 giorni. Sia gli studi *in vitro* che *in vivo* dimostrano una maggiore sopravvivenza delle isole di piccole dimensioni rispetto a quelle di grandi dimensioni. Inoltre, visto che la concentrazione di glucosio che arriva al centro dell'isola grande è minore, questo provoca un minor rilascio di insulina. La rivascolarizzazione delle isole è un processo complesso che

comprende la digestione della parete dei vasi per opera delle proteasi e la migrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali (ECs). Una volta ricostituito il vaso, le ECs producono platelet-derived growth factor (PDGF) che richiama le cellule di supporto, tra cui le cellule staminali mesenchimali (MSCs) che contribuiscono alla migrazione delle ECs producendo proteasi. Le MSCs possono inoltre up-regolare la sintesi di angiopoietina e VEGF da parte delle ECs ed hanno anche attività immunomodulatoria. L'idea di Ulrika Johansson e collaboratori è stata di unire le MSCs alle isole. La presenza delle MSCs aumenta la capacità delle EC di coprire la superficie delle isole; inoltre le ECs emettono prolungamenti sia nella matrice sia all'interno dell'isola, il che potrebbe facilitare la rivascolarizzazione<sup>162</sup>.

### **1.8.5 - Sviluppo embriologico del pancreas endocrino**

La conoscenza dei meccanismi di sviluppo del pancreas, dei fattori coinvolti nei vari stadi differenziativi e dei marcatori specifici del differenziamento è importante al fine di poter riprodurre ex-vivo gli eventi di commissionamento. Numerose molecole induttrici del differenziamento sono state individuate, molte rimangono oscure.

Il pancreas nasce dall'endoderma dell'intestino anteriore sotto forma di due gemme separate, una ventrale e una dorsale. Ogni gemma è costituita da una zona midollare interna di cellule epiteliali e una corticale esterna di cellule mesenchimali; il contatto tra le due zone è di vitale importanza per lo sviluppo del pancreas. L'epitelio dell'endoderma prolifera per effetto di varie molecole della famiglia FGF prodotti dal mesenchima e al giorno embrionale di gestazione 9.5 (e9.5, nel topo), le gemme iniziano ad invaginarsi subendo così l'allungamento e la ramificazione dentro il mesenchima pancreatico fino a formare un network di rami duttali.

Al e10.5 possono essere trovate alcune cellule esprimenti insulina e glucagone. Questa fase è definita "prima onda" di cellule endocrine che però non esprimono markers maturi e non influiranno sulla composizione finale delle isole.

Al e12.5 le gemme si fondono per formare un singolo organo.

Al e13-16 avviene la "transizione secondaria" in cui vi è un aumento notevole di cellule endocrine che gemmano dall'epitelio duttale e che faranno parte delle isole mature.

Al e18.5 le cellule endocrine migrano nel circostante tessuto acinare organizzandosi in isole.

I rami epiteliali sono costituiti da due microdomini: TIP e STALK. Prima della transizione secondaria, i progenitori indifferenziati sono dentro i TIPs poi, quando passano agli STALKs, acquisiscono la capacità di generare progenitori endocrini e cellule duttali differenziate. Le cellule TIP tardive originano le cellule acinari.

Durante le fasi di sviluppo occupano ruoli di grande importanza i fattori epiteliali e quelli derivanti dal mesoderma intestinale circostante. Primi tra tutti sono quelli espressi dalla notocorda, come activina e FGF2 (o bFGF), per reprimere la segnalazione di Sonic Hedgehog (Shh) e iniziare l'induzione nella regione endodermica di Pdx-1. Inizialmente il

dominio pancreatico è caratterizzato dall'espressione sovrapposta di PDX-1, di Ptf1a e Hb9 (homeobox gene 9). La decisione nella differenziazione tra destino esocrino ed endocrino è regolata sia temporalmente che spazialmente. All'inizio le cellule esprimono poco recettore Notch e il suo ligando Delta ma, con l'aumentare delle interazioni cellulari, aumenta anche la loro espressione, la cui segnalazione porta all'attivazione di Hes-1. Questo fattore inibisce Ngn3 portando ad un differenziamento esocrino. Ngn3 marca invece i progenitori endocrini. Questi progenitori sono stati ritrovati sia nei dotti che nelle loro vicinanze. L'epitelio pancreatico diventa precocemente competente a formare cellule  $\alpha$ . La competenza a formare cellule produttrici di insulina appare al e10.5-14.5, più tardi si acquisisce quella a formare cellule PP e  $\delta$ . Tutti questi spostamenti sembrano mediati da cambiamenti intrinseci all'epitelio.

Isl-1 è, insieme a PDX-1, tra i primi induttori espressi: ha un ruolo cruciale nello sviluppo della componente endocrina ed è localizzato sia nelle cellule epiteliali che mesenchimali. Pax 4: è espresso nei progenitori pluripotenti ed è richiesto durante la seconda transizione per il differenziamento  $\beta$ . Arx è un fattore di trascrizione che promuove il differenziamento  $\alpha$ . Pax6: marca progenitori di cellule  $\alpha$  e  $\beta$ . Nkx2.2: regola il differenziamento  $\beta$  parallelamente a Pax 4. Nkx6.1 si trova invece soprattutto nelle cellule  $\beta$  delle isole adulte.

L'acido retinoico è coinvolto nel definire i confini posteriore ed anteriore dell'intestino posteriore dentro l'endoderma. Agisce nella formazione della gemma dorsale prima dell'espressione di Pdx-1 ma dopo la specificazione pancreatica. Influenza la decisione tra esocrino ed endocrino: ne regola la proporzione durante gli stadi tardivi dello sviluppo. Un'abbondanza di RA stimola il differenziamento endocrino e duettale a spese dell'esocrino.

VEGF A: la sua espressione inizia al e13.5 nelle cellule endocrine in sviluppo ed è necessario per la formazione dei vasi nell'isola. Reciprocamente le cellule endoteliali hanno un ruolo induttivo nello sviluppo delle isole. Il VEGF non è espresso nelle cellule endocrine adulte: la sua azione nell'aumento della massa dell'isola è mediata attraverso lo stimolo delle cellule endoteliali e non tramite l'induzione dei progenitori multipotenti pancreatici.

CTGF (fattore di crescita del tessuto connettivo) fa parte di un gruppo di proteine che modulano molti pathway di crescita. Viene espresso al e12.5 nelle cellule  $\beta$ , nei dotti e nelle cellule endoteliali. Regola la proliferazione di cellule  $\beta$  embrionali ed è richiesto durante la seconda onda per la specifica collocazione del lineage.

TGF  $\beta$ : gli esperimenti *in vitro* sono conflittuali per quanto riguarda il suo ruolo nel regolare la percentuale di cellule endocrine ed esocrine durante lo sviluppo<sup>154, 163</sup>.

L'epitelio pancreatico differenzia dunque nei tessuti endocrini dell'isola, ma anche il mesenchima è in grado di formare isole di cellule  $\beta$ : questa transizione è detta mesenchima-epiteliale (MET)<sup>161</sup>. La sostituzione dell'epitelio pancreatico con quello intestinale impedisce la MET dimostrando che il primo è necessario per la formazione delle isole. Similmente, l'epitelio pancreatico coltivato senza mesenchima, non permette la formazione di isole pancreatiche normali e in ugual numero, dimostrando la necessaria specifica interazione delle due zone.

L'incorporazione di BrdU in cellule epiteliali cresciute con e senza mesenchima, ha mostrato che il mesenchima influisce sulla proliferazione delle cellule Pdx-1-positive, cioè i progenitori pancreatici precoci<sup>164</sup>. Le cellule mesenchimali del pancreas in sviluppo esprimono il fattore di trascrizione Islet-1 e Nestina<sup>163</sup>. Dati sperimentali dimostrano la presenza di un precursore comune per pancreas e fegato. Un tipo di cellula con questa caratteristica è la nestin expressing islet-derived progenitor (NIP), isolata da una sospensione di tessuto pancreatico adulto.

Nei pancreas fetali vengono espressi:

- Oct-4: fattore di trascrizione nucleare appartenente alla famiglia POU (Pic-Oct-Unc); è un marcatore di cellule staminali totipotenti ed è un regolatore chiave nello sviluppo precoce dell'embrione. Viene espresso insieme a Ngn3 (circa 70%) e Nestina (circa 65%) e non è espresso nelle cellule muscolari lisce, cellule endoteliali ed esocrine.
- Ngn3 : caratterizza progenitori endocrini sia nei dotti che nelle loro vicinanze
- Cromogranina A: peptide espresso nelle cellule endocrine. Non è coespressa con Oct-4 ma parzialmente con Ngn3.
- Nestina: filamento intermedio di classe VI. In origine è stato descritto come un marker di cellule staminali/progenitrici neuronali. Le cellule nestina-positive isolate da pancreas possono essere indotte a cellule produttrici di insulina. Le cellule Nestina-positive duplicano velocemente (44 h) e possono essere indotte a differenziare verso un fenotipo adiposo, osteoblastico e pancreatico endocrino<sup>163</sup>.

### **1.8.6 - Cellule Staminali Pancreatiche**

L'esistenza di cellule staminali all'interno del pancreas adulto è indicata dalla capacità dell'organo di rigenerare la propria componente endocrina in varie condizioni: durante la gravidanza, successivamente a pancreatectomia parziale, in animali resi diabetici chimicamente. Molti studi di isolamento e differenziamento mostrano che all'interno del pancreas, in particolare nei dotti pancreatici, tra le cellule acinari e nelle isole di Langerhans, possono risiedere cellule progenitrici/ staminali adulte<sup>165</sup>. Il gruppo di Eberhardt et al<sup>163</sup> è stato in grado di isolare cellule dalle isole pancreatiche, di immortalizzarle e di mostrare la coespressione di nestina e Isl-1. La presenza di entrambi questi fattori indica che le cellule sono ad uno stadio precoce della loro maturazione: non esprimevano né Ipf-1 né insulina. Per supportare l'ipotesi che fossero MSCs ha condotto i differenziamenti adipocitico e osteocitico ottenendo risultati positivi. Inoltre, dopo trapianto nel fegato di topi SCID, queste cellule si sono impiantate ed hanno acquisito un fenotipo epatico dimostrando potenziale differenziativo endodermico *in vivo*. Il gruppo di Xiao Mei è riuscito ad isolare una linea monoclonale di cellule epiteliali derivate dalla coltura di isole di pancreas fetale ed espanderla per 50 passaggi senza alterazioni cromosomiche. Sono state indotte sia in senso neuronale che pancreatico endocrino con risultati soddisfacenti: sono state in grado infatti di rilasciare insulina sia *in vitro* che *in vivo*. L'analisi dei marcatori ha permesso di stabilire che le cellule isolate

hanno proprietà staminali correlate a pancreas, tessuto epiteliali e nervoso, ma non a mesenchima o ematopoiesi<sup>166</sup>. La matrice extracellulare (MEC) è una componente importante nello sviluppo delle isole in quanto contiene fattori trofici e di crescita e proteine di adesione quali la laminina e il collagene. Durante la purificazione delle isole la MEC viene persa e alcuni lavori ne hanno mostrato l'importanza per l'effetto sulla proliferazione cellulare. Isole fresche coltivate su piastre coattate con matrigel formano, in 4 giorni, monolayer di cellule epiteliali che risultano negative alla colorazione con dithizone (DTZ), un marcatore di cellule captanti lo Zinco - quali le cellule beta. L'induzione di queste cellule con KGF provoca un aumento della proliferazione e successiva aggregazione in strutture isola-simili positive alla colorazione con DTZ. Si è anche dimostrato che il numero di isole ottenute da topi diabetici STZ-indotti è lo stesso di quelle ottenute da topi sani dimostrando che il numero dei precursori si mantiene nonostante la glicemia elevata<sup>165</sup>.

Un altro tipo cellulare che mostra caratteristiche staminali è il progenitore esprimente nestina derivato dalle isole (NIP). La nestina è un filamento intermedio ed è solitamente espressa nel cervello e nel pancreas endocrino in sviluppo. Queste cellule esprimono markers di staminalità: stem cell factor (SCF), c-kit, CD90 (potenziale marker per cellule staminali/progenitrici epatiche). Sono localizzate sia nelle isole che nei dotti e sono negative a: insulina, glucagone, somatostatina, PP, collagene IV (marker endoteliale), galanina (marker neuronale), CK19 (marker duttale). Sono state trovate sia in pancreas adulti che fetali senza differenze di espressione. Sono cellule multipotenti e diversi studi concordano sul loro potenziale differenziativo. Nel lavoro di H. Huang e X. Tang le cellule NIP sono state isolate da pancreas fetali in terreno privo di siero e contenente bFGF, sono state caratterizzate e poi indotte al differenziamento endocrino pancreatico<sup>167</sup>. In superficie presentano, oltre alla nestina, il marker ABCG2/BCRP1 e, se non vengono tagliate, formano spontaneamente degli aggregati ICCs (islet-like cell cluster). Gli ICCs possono essere subclonati in maniera riproducibile. Al primo stadio le cellule dell'ICC sono ancora indifferenziate in quanto risultano nestina-positive, glucagone ed insulina negative e presentano alti livelli dei trascritti di ABCG2 e c-MET. Successivamente, se viene eliminato dal terreno il bFGF ed è aggiunto il siero, le ICCs si espandono, il numero aumenta notevolmente, le cellule più periferiche diventano positive per il glucagone ed appaiono gli mRNA dei geni di differenziamento pancreatico: PDX-1, GLUT-2, HGF, glucagone e somatostatina. L'ultimo stadio comporta la conversione delle NIPs in cellule  $\beta$  e si ottiene con l'aggiunta di fattori che promuovono il differenziamento: glucosio ad alte concentrazioni, HGF, IGF, nicotinammide e betacellulina. Le cellule diventano positive all'insulina e ciò indica la derivazione dalle NIP. L'analisi dell'mRNA mostra che vengono espressi i markers delle cellule  $\beta$  (insulina, Nkx6.1, Isl-1) e delle cellule duttali, la CK19; l'espressione di PDX-1 non è più visualizzata e si ha una down-regolazione di nestina e ABCG2. L'impianto di circa 500 NIP-ICCs a livello renale subcapsulare di topi diabetici, reverte l'iperglicemia a livello significativo. *In vitro* possono essere anche indotte in senso epatico e, se infuse nel fegato di topi SCID, transdifferenziano in cellule epatiche producenti albumina<sup>158</sup>. Nello studio di Zhao et al.<sup>168</sup> si è ulteriormente dimostrata la presenza di

precursori sia nel tessuto esocrino sia nell'endocrino derivante da numerosi pancreas di soggetti diversi per età e sesso. L'analisi di RT-PCR ha rivelato la presenza dell'mRNA di CD34, Oct-4 e Sox-2. La presenza di Sox-2 e Oct-4 è stata confermata in immunohistochimica. Le cellule positive per questi markers si ritrovano nei dotti o nelle loro vicinanze ma sono negative per la CK19, marker epiteliale, insulina e nestina indicando lo stato di staminalità. Un'altra popolazione di progenitori staminali ricavati dal tessuto pancreatico sembra essere quella delle cellule stellate, le quali risultano positive a ABCG2, Nestina, Thy-1, N-Cam, vimentina (marker mesenchimale), desmina (marker miogenico), alfa-actina (marker del muscolo liscio), GFAP (marker di staminalità neuronale), cromogranina A (marker neuroendocrino). Morfologicamente presentano abbondanti lisosomi, RER ipertrofico, poche gocce lipidiche, fibre di collagene nell'ambiente extracellulare. Possono essere selezionate dalle altre cellule pancreatiche tramite l'utilizzo di un farmaco, il mitoxantrone, che è tossico per le cellule deficitarie della pompa ABCG2. Crescono velocemente in monolayer di cellule fibroblastoidi ma, se lasciate in coltura tenderanno a formare spontaneamente degli aggregati tridimensionali. Queste strutture possono essere indotte in senso pancreatico endocrino con un terreno DMEM/F12 contenente exendina-4 e ITS e coltivandole su matrigel. L'analisi ultrastrutturale degli aggregati mostra dei cambiamenti morfologici: le cellule appaiono più piccole ed omogenee, i nuclei tondi e la cromatina elettron-densa, aumenta il numero dei mitocondri, vi sono abbondanti granuli elettron-densi. I cluster esprimono basalmente Pdx-1 e, l'induzione per due settimane ne provoca l'aumento di espressione; inoltre diventano positive anche per insulina, glucagone, IAPP, GLUT-2, convertasi PC1/3 e PC2, CK19; al contrario, i geni esocrini non vengono espressi. Prove di stimolazione attraverso concentrazioni variabili di glucosio mostrano una differenza di secrezione insulinica significativa<sup>169</sup>. Esistono molte evidenze che indicano l'esistenza di una popolazione progenitrice contenuta nella componente esocrina del pancreas. Questa regione può essere separata dalla controparte endocrina tramite gradiente di densità: le cellule più dense sono le esocrine. Esse possono essere coltivate e mantenute in uno stato altamente proliferativo dalla morfologia fibroblastoide in IMDM al 10% FCS con l'aggiunta di PDGF. La caratterizzazione fenotipica di queste cellule tra il 2° e l'8° passaggio mostra che sono negative per l'HLA I, CD31, CD34, CD106 e sono positive per CD54, CD44, CD90 e CD105; questo pattern è molto simile a quello delle BM-MSC. Al pari di queste, possono essere indotte verso un fenotipo condrocitico e adipocitico. L'analisi dell'mRNA tra il passaggio 0 e il 7° mostra che vengono espressi i fattori di trascrizione importanti per lo sviluppo del pancreas endocrino: Pdx-1, Isl-1, Nkx2.2, Nkx6.1, Neuro D, Ngn3 e Nestina; l'espressione di insulina e glucagone cala dopo il 1° passaggio. Coltivando le P-MSC in terreno differenziativo pancreatico endocrino (DMEM ad alta concentrazione di glucosio, nicotinammide, activina A e HGF) si ha l'espressione dei geni sopra citati, di insulina, API (proteina localizzata nelle cellule  $\alpha$ ) e CK19<sup>170</sup>. Embriologicamente, le isole pancreatiche originano soprattutto dalle cellule duttali e questo rende i dotti la fonte più accreditata per l'isolamento di cellule staminali da pancreas. Bonnie e collaboratori nel 2000 isolarono, coltivarono ed indussero tessuto non endocrino al

differenziamento su matrigel. Questa è una matrice solida in cui le cellule formano strutture tridimensionali isola-simili di grandezza che va da 50 a 400 $\mu$ M. Inizialmente le cellule coltivate in monolayer mostrano fenotipo soprattutto epiteliale (sono positive alla citokeratina CK19) con qualche contaminante fibroblastico e pochissime cellule positive all'insulina; col passare delle settimane e con la formazione delle strutture tridimensionali aumenta il contenuto di insulina. Inoltre alcune cellule delle strutture diventano positive per glucagone e somatostatina. Una minoranza è positiva a tutti e tre i tipi di cellule endocrine dimostrando che sono le più indifferenziate. Le prove di rilascio di insulina *in vitro* in risposta ad aumento della concentrazione di glucosio hanno mostrato un aumento di secrezione di circa 3 volte<sup>171</sup>. Un esperimento simile è stato eseguito dal gruppo di Han Tso Lin: le cellule ottenute dai dotti tendono a formare degli aggregati pochi giorni dopo la loro messa in coltura. Al 10° e 20° passaggio vengono indotte in senso pancreatico su matrigel e tramite terreno DMEM/F12 addizionato di ITS, privo di siero. Dopo 4 settimane la colorazione con DTZ risulta positiva, sono presenti gli mRNA di insulina, glucagone e somatostatina e la secrezione di insulina è significativamente maggiore rispetto alle cellule non differenziate; infine il pannello dei marcatori mesenchimali delle cellule non indotte è in buona parte comparabile con quello delle BM-MS<sup>172</sup>. Il gruppo di Seeberger ha posto il tessuto privo di isole in terreno RPMI al 10% FBS ottenendo aggregati. Per isolare MSCs dagli aggregati si sono posti questi ultimi in terreno di espansione e le cellule sono state analizzate nei vari passaggi in citofluorimetria. Al giorno 0 le cellule sono positive all'80% alla CK19, solo al 2% alle cellule  $\beta$  e al 7% alle cellule acinari. Con l'aumentare dei passaggi questi markers calano e vengono espressi quelli mesenchimali. L'induzione in senso osteocitico e condrocitico risulta positiva fino al 12° passaggio e quella adipocitica solo fino al 4°. L'induzione in senso epatico è risultata positiva. L'induzione in senso pancreatico endocrino di cellule tra il 2° e 6° passaggio non è stata invece totalmente soddisfacente: vengono espressi molti geni pancreatici ma l'analisi di IHC delle proteine corrispondenti risulta negativa indicando che l'mRNA non veniva tradotto<sup>173</sup>.

### **1.8.7 - Induttori del differenziamento pancreatico endocrino**

Sono numerose le metodiche riportate in letteratura per indurre *in vitro* il differenziamento di diversi tipi di cellule staminali verso fenotipi pancreatici endocrini. Non esiste tuttavia un protocollo consolidato ed ampiamente applicato. In molti casi, inoltre, il meccanismo di azione degli induttori rimane oscuro. Le sostanze più frequentemente utilizzate come induttori sono:

- Nicotinamide: inibitore della ADP-ribosio polimerasi (PARP), attiva la cascata dell'AMPciclico; può indurre le cellule staminali epatiche o i progenitori pancreatici in cellule producenti insulina, protegge le cellule  $\beta$  dalla desensibilizzazione dovuta ad un'elevata esposizione di glucosio. Il meccanismo d'azione rimane in gran parte oscuro.
- Exendina-A: agonista di glucagone like peptide 1 (GLP-1) in quanto agisce attraverso il suo recettore; è un potente induttore del differenziamento delle isole pancreatiche, promuove sia la replicazione

delle cellule  $\beta$  sia la neogenesi di precursori dai dotti pancreatici; inibisce l'apoptosi delle cellule  $\beta$  e ne aumenta l'attività e il rilascio di insulina.

- $\beta$  cellulina: regola la crescita e/o differenziamento dei precursori endocrini pancreatici.

- Activina A: membro della famiglia dei TGF-  $\beta$ , regola la neogenesi delle cellule  $\beta$  *in vivo*.

- Glucosio: ad una concentrazione di 20-30mM promuove la replicazione delle cellule  $\beta$  sia *in vitro* che *in vivo*; a 23mM induce le cellule staminali adulte epatiche verso cellule endocrine pancreatiche secernenti ormoni; a 5mM aumenta il contenuto di insulina nelle linee cellulari derivate da cellule staminali embrionali.

- $\beta$  –mercaptoetanololo: induttore neurale

- Sodio piruvato: utilizzato per la sintesi di alcuni amminoacidi:Ala, Tyr, Phe, Tpt.

- EGF: fattore di crescita epidermico

- bFGF: fattore di crescita fibroblastico

- HGF: fattore di crescita degli epatociti; svolge un'attività mitogena, motogena, morfogenetica ed anti-apoptotica in diversi tipi cellulari, quali cellule del tubo renale, endoteliali, condrociti, osteoblastiche, ematopoietiche.

Si suppone che *in vivo*, in modelli animali quali il ratto reso diabetico con streptozotocina o il topo NOD-SCID, esistano anche ulteriori segnali induttori del differenziamento pancreatico endocrino, sinergicamente in grado di svolgere una importante pressione per il commissionamento delle cellule competenti endocrine.

## 1.9 Frazionamento di MSC in Campo Flusso

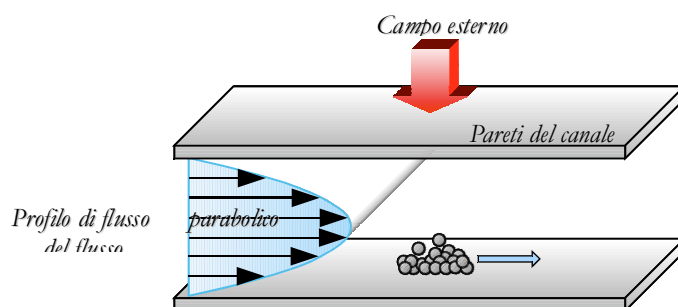
### 1.9.1 Frazionamento in Campo Flusso (FFF)

Le tecniche di frazionamento in campo flusso (Field-flow Fractionation, FFF) sono una famiglia di tecniche separative a flusso, finalizzate al frazionamento e alla caratterizzazione di sistemi nano e microdispersi. Esse appartengono all'ampia categoria delle tecniche analitiche di tipo cromatografico a fase singola, in cui la separazione non avviene per interazione dell'analita con una fase stazionaria, ma per azione combinata di un flusso di fase mobile e di un campo di forze esterno applicato ortogonalmente alla direzione del flusso. Le tecniche FFF realizzano un frazionamento di tipo *soft*, altamente bio-compatibile e particolarmente adatto per campioni di interesse biologico. Un tipico sistema FFF, pur essendo simile ai sistemi comunemente adottati in HPLC, si distingue per la presenza del *canale* al posto della tradizionale colonna cromatografica.



Gli elementi che costituiscono il sistema FFF sono: riserva di fase mobile, pompa, valvola d' iniezione, elemento frazionatore (canale FFF), rivelatore, collettore di frazioni e un sistema di acquisizione ed elaborazione dati (PC).

Il canale FFF è un capillare generalmente piatto, tipicamente costruito in materiale inerte e non contenente alcuna fase stazionaria. Al suo interno scorre un flusso laminare di fase mobile, caratterizzato da un profilo parabolico di velocità. La separazione è realizzata mediante l'applicazione di un campo in direzione perpendicolare a quella del flusso di fase mobile. Sotto l'effetto di un campo di forze esterno applicato ortogonalmente al flusso longitudinale di fase mobile, viene realizzata la separazione degli analiti. Gli analiti diversi per massa, densità, dimensione e per altre proprietà fisiche, sono guidati dal campo applicato al sistema in regioni del canale governate da velocità di eluizione diverse, dovute al profilo parabolico assunto dal flusso longitudinale di fase mobile attraverso il canale.

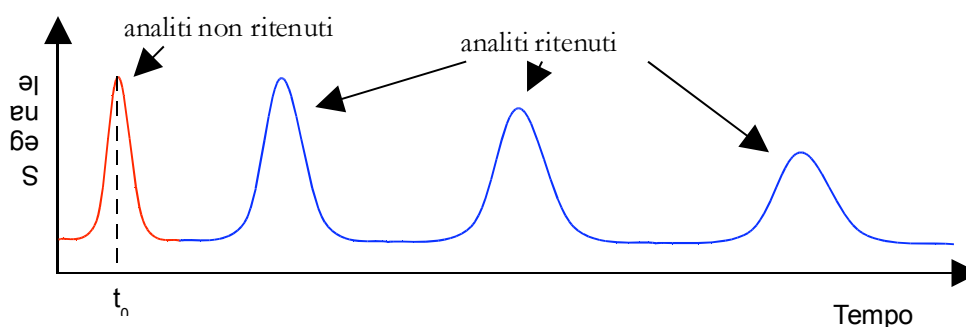


Sezione di un canale FFF

Secondo questo principio separativo, si ottiene un valore di velocità pari a zero in corrispondenza delle pareti del canale e un progressivo aumento di tale valore spostandosi verso il centro del canale, dove la velocità degli analiti raggiunge i valori massimi<sup>174</sup>.

Il grafico mostrato in figura, definito *frattogramma*, riproduce la risposta del rivelatore posto all'uscita del sistema di frazionamento in funzione del tempo di eluizione. Il primo picco del frattogramma rappresenta il picco del *void*, mentre il resto dei picchi è dovuto ad analiti più o meno ritenuti.

Esempio di frattogramma



Il campione risponde all'azione del campo in base alle proprietà morfologiche, questa risposta risulta dipendente anche dall'intensità del campo applicato.

Il modo con il quale gli analiti si distribuiscono nel profilo parabolico del flusso (*modo operativo*) è di fondamentale importanza al fine della separazione: gli analiti che si trovano al centro del flusso parabolico eluiscono con velocità massima. La distribuzione relativa degli analiti determina l'ordine di eluizione, la selettività, l'efficienza ed altre caratteristiche separative.

### **1.9.2 - Frazionamento in Campo Flusso Gravitazionale (GrFFF)**

La variante della FFF che sfrutta come campo esterno il campo gravitazionale, nota anche con l'acronimo *GrFFF*, rappresenta la variante FFF maggiormente utilizzata per la separazione e caratterizzazione di analiti con diametro compreso tra 1 e 100  $\mu\text{m}$ . Essa è la sottotecnica più semplice ed economica, in quanto non richiede alcun tipo di sistema specifico per generare il campo, ma sfrutta il campo gravitazionale terrestre che agisce ortogonalmente al flusso longitudinale di fase mobile. Gli analiti vengono separati in funzione delle loro dimensioni, densità e caratteristiche morfologiche e/o superficiali che influenzano le forze di sollevamento. Nel processo di separazione intervengono interazioni elettrostatiche particella-parete che dipendono dalla natura della parete del canale, dalle caratteristiche superficiali della particella e dalla composizione della fase mobile, con particolare riferimento alla forza ionica e all'eventuale presenza di agenti tensioattivi. Durante il processo di separazione si generano effetti idrodinamici, dovuti alle forze di sollevamento (dette forze di lift idrodinamico) determinate dalla repulsione che si crea all'avvicinarsi delle particelle in movimento alla parete del canale non perfettamente planare.

L'insieme di questi fattori fa in modo che le particelle non viaggino a diretto contatto con la parete del canale, ma si trovino ad una distanza specifica che rappresenta il punto di equilibrio delle forze gravitazionali, idrodinamiche ed elettrostatiche che agiscono sulla particella.

Le particelle di dimensioni maggiori hanno un minore rapporto di ritenzione e fluiscono in tempi più brevi.

Il canale GrFFF convenzionalmente ha forma rettangolare in estensione e sezione, ed è ricavato da un foglio di materiale plastico (denominato *spacer* di spessore compreso tra 80 e 250  $\mu\text{m}$ ), ritagliando e rimuovendo la porzione centrale.

La separazione dei campioni mediante la tecnica GrFFF, è realizzata attraverso tre operazioni fondamentali: iniezione, rilassamento ed eluizione. Nella *fase di iniezione*, il campione viene iniettato mediante una siringa Hamilton nel capillare d'ingresso del canale. Successivamente viene effettuato il *processo di rilassamento* (o *stop flow*), che si ottiene interrompendo per un certo intervallo di tempo il flusso di fase mobile. Durante questo periodo di tempo, il campione di cellule sedimenta in prossimità della parete di accumulazione del canale

prima di eluire. In questo modo vengono raggiunte le condizioni di equilibrio tra flusso e campo gravitazionale terrestre.

All'uscita del dispositivo di frazionamento, è collegato un sistema di rilevamento UV/Vis per monitorare il *processo di eluizione*. Le cellule eluite vengono raccolte in un collettore di frazioni posto all'uscita del rivelatore e in questo modo vengono raccolte le diverse popolazioni cellulari separate.

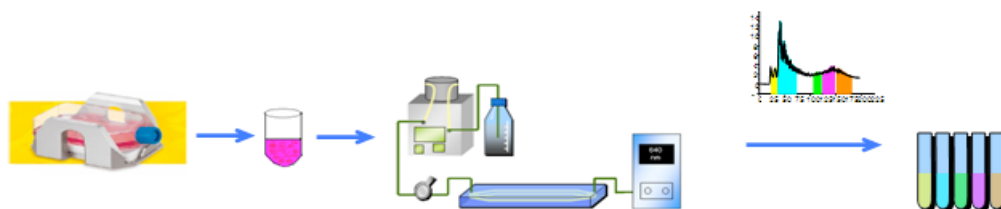
### 1.9.3 - Variante NEEGA-DF per il frazionamento di MSC

Il sistema separativo GrFFF realizza la separazione secondo una modalità non invasiva che permette il mantenimento delle caratteristiche native dei campioni e per questo, viene considerato *soft*. L'ampio utilizzo di questo sistema per il frazionamento e la caratterizzazione di campioni biologici è favorito dall'assenza di una fase stazionaria, in questo modo non si verificano interazioni indesiderate dei campioni biologici con essa. In aggiunta, si ha un'elevata bio-compatibilità associata alla possibilità di utilizzare materiali plastici completamente bio-compatibili, facilmente sterilizzabili ed eventualmente *usa e getta*.

Il meccanismo soft di separazione nonché il mantenimento della vitalità cellulare e l'elevata biocompatibilità del sistema separativo della tecnica GrFFF, ha portato ad ipotizzare l'applicazione di questa tecnica anche alle cellule staminali.

Al fine di sfruttare la tecnica GrFFF per la separazione di cellule aderenti quali le MSC si è reso necessario mettere a punto una variante per evitare interazioni cellula/cellula e cellula/parete di accumulazione - che avrebbero potuto compromettere le caratteristiche del campione, il recupero, e dunque il possibile utilizzo successivo.

La variante, sviluppata e brevettata dal gruppo di ricerca del laboratorio di Chimica Analitica del Dipartimento "G. Ciamician" dell'Università di Bologna in collaborazione con il nostro gruppo, realizza il frazionamento del campione in flusso, in condizioni di non equilibrio, da cui deriva l'acronimo NEEGA-DF (*Non Equilibrium Earth Gravity-Assisted-Dynamic Fractionation*). In questo modo sono stati risolti i problemi derivanti dal rilassamento nel caso di campioni di cellule adese.



Flusso di lavoro per il frazionamento in canale NEEGA-DF: le cellule vengono raccolte, contate, sospese in terreno di coltura, separate tramite il canale NEEGA-DF. Un rivelatore UV/Vis monitora l'eluizione. Frazioni eluite in tempi diversi possono essere raccolte in condizioni sterili, tutto il processo si svolge infatti sotto cappa a flusso laminare.

Questo metodo realizza il frazionamento delle cellule in base alle caratteristiche bio-fisiche acquisite in condizioni dinamiche, cioè ottenute

in sospensione nel fluido di trasporto. Le caratteristiche native delle cellule, vengono riacquisite quando ritornano in adesione, al termine del processo di frazionamento. Con la GrFFF e la sua variante di non equilibrio NEEGA-DF è possibile utilizzare qualsiasi tipo di fase mobile, anche il terreno di coltura delle cellule, che garantisce l'ottimale trattamento del campione, garantendo così la vitalità cellulare durante la separazione e quindi il massimo recupero di cellule selezionate. Le cellule frazionate, quindi, possono essere rimesse in coltura al termine del processo separativo oppure possono essere immediatamente utilizzate per scopi clinici o di ricerca. In generale, tali tecniche presentano molti vantaggi: strumentazione semplice, a basso costo, sterilizzabile mediante autoclave oppure realizzabile in materiale *usa e getta* molto conveniente in ambiente clinico-ospedaliero. Il profilo fattografico appare distintivo del campione frazionato e può essere sfruttato a fini separativi o di caratterizzazione.

## 2 – Obiettivi

Gli studi qui riportati hanno voluto investigare l'esistenza in molteplici tessuti adulti di popolazioni cellulari con caratteristiche simili alle Cellule Staminali Mesenchimali (MSC). Protocolli per l'isolamento e la purificazione sono stati messi a punto per i diversi tessuti. Le popolazioni ottenute sono state confrontate per determinare le caratteristiche comuni e le specificità legate al tessuto di origine.

Le MSC furono individuate inizialmente nel midollo osseo, ove costituiscono lo stroma di supporto dell'emopoiesi. Esse dispongono di potenziale differenziativo verso numerosi tipi cellulari di derivazione mesodermica, possiedono importanti capacità immunomodulatorie e trofiche: tali proprietà candidano le MSC all'utilizzo terapeutico in una varietà di patologie.

Popolazioni simili alle MSC sono state individuate anche in tessuti diversi dal midollo osseo. Alcune sorgenti di MSC appaiono dunque vantaggiose dal punto di vista della disponibilità o della resa quantitativa, altre potrebbero essere vantaggiose per approcci mirati a specifici tessuti.

I tessuti della placenta a termine sono sorgenti molto accattivanti per via del ruolo e dell'età biologica delle cellule che vi sono contenute. Si tratta di tessuti considerati di scarto, ampiamente disponibili, ed il cui utilizzo è libero da problematiche etiche. Così come il recupero di staminali ematopoietiche da sangue cordonale, anche il prelievo di MSC da placenta a termine è una procedura ad "invasività zero". Se venisse effettuato bancaggio su larga scala si potrebbe disporre di cellule con elevato grado di compatibilità per finalità di utilizzo allogenico, o addirittura di cellule per utilizzo autologo.

E' stato ipotizzato che le MSC, per via delle loro caratteristiche rigenerative, trofiche ed immunomodulatorie, potrebbero essere utilmente impiegate in patologie immuno-mediate quali le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD), o essere di aiuto nella terapia diabete mellito (DM). Per queste ragioni abbiamo deciso di investigare i tessuti sede della patologia, alla ricerca di cellule con caratteristiche di MSC possibilmente dotate di potenzialità tessuto-specifiche.

La letteratura mostra l'importanza dello stroma intestinale nel mantenimento della nicchia staminale epiteliale, nel controllo del differenziamento dell'epitelio e nella gestione della risposta immunitaria a livello della mucosa. Viene sottolineata anche l'implicazione di tale tessuto nella fase patogenetica e di cronicizzazione delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD). Cellule simili alle MSC derivate dallo stroma intestinale, espandibili fino a volumi clinicamente rilevanti, dotate di capacità immunomodulatorie e trofiche, potrebbero diventare un importante strumento per il trattamento delle IBD.

Le cellule stromali delle isole di Langerhans del pancreas potrebbero avere ruoli riparativi e trofici nel contesto del trapianto di isole, una terapia già in pratica clinica per il diabete mellito di tipo I. Queste cellule, ampiamente espandibili e bancabili, potrebbero inoltre possedere potenzialità differenziative verso fenotipi endocrini, il che aprirebbe scenari di grande interesse.

Numerosi protocolli terapeutici in valutazione in trial clinici di fase II e III sfruttano l'attività immunosoppressiva delle MSC. Esistono però importanti variabilità nell'effetto delle diverse preparazioni di MSC. Attualmente non viene definito un dosaggio rispetto all'attività funzionale delle cellule, ma solo rispetto al numero di cellule da trapiantare. Abbiamo dunque ricercato marcatori biologici correlati con la capacità immunosoppressiva, che potrebbero essere utili per la determinazione a priori del dosaggio o per la scelta delle preparazioni candidate al trapianto.

## 3 – Materiali e Metodi

### 3.1 – Materiali

16 ratti Lewis maschi di sei settimane (Charles River Laboratories)  
Acido ascorbico (SIGMA)  
Acido piruvico (SIGMA)  
b-cellulina (SIGMA)  
 $\beta$ -glicerolfosfato (SIGMA)  
b-mercaptoetanololo (SIGMA)  
b-FGF (R&D)  
Acqua distillata (GIBCO)  
Acquovitrex (CARLO ERBA)  
Activina A (SIGMA)  
Agarosio (SIGMA)  
Alcool  
Anticorpi per citofluorimetria ed immunofluorescenza: Oct-4, Nestina, Sca-1, SSEA-4, Stro-1, vWF, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, PanCK, HLA-I, HLA-II, insulina, glucagone, anticorpi secondari anti-IgG (Ancell Clone, Alexis ALX, RELIATech, Santa Cruz, R&D Clone, EXBIO Clone)  
BSA (SIGMA)  
Ipoclorito di sodio  
CHANG medium D (IRVINE SCIENTIFIC).  
Collagenasi IV 1 mg/ml (SIGMA)  
Colorante 10x Bluejuice (INVITROGEN)  
Dexametazone - DEX (SIGMA)  
Dimetilsolfossido – DMSO (SIGMA)  
Dithizone (DTZ) (SIGMA)  
DMEM con L-Glu: Terreno Eagle modificato da Dulbecco - Dulbecco's modified Eagle's medium (LONZA)  
DMEM/F12 (LONZA)  
EGF madre 10  $\mu$ g/ml (SIGMA).  
Emallume di Mayer  
Etanolo 90% (SIGMA)  
Etidio bromuro (SIGMA)  
FBS (Siero Fetale Bovino): scomplementato a 56°C per 40' (LONZA).  
Ficoll Hystopaque 1,077 (SIGMA)  
Fissativo Intraprep 1  
Formaldeide (SIGMA)  
Fosfato bisodico  
HEPES madre 1M  
IBMX (3-isobutilmetilxantina) (SIGMA)  
Indometacina (SIGMA)  
Insulina (SIGMA)  
Isopropanolo 60%  
ITS (SIGMA)  
Kit di amplificazione: PCR with platinum Taq DNA polimerasi (QUIAGEN)  
Kit di estrazione RNA (QUIAGEN)  
Kit di retrotrascrizione (QUIAGEN)

L-Glutamina 4 mM (MP-biomedicals)  
LP lisato piastrinico (KEDRION)  
Marker: 1 kb plus DNA ladder (INVITROGEN)  
Matrigel (BECKTON DICKINSON)  
Nicotinammide (SIGMA)  
Nitrato d'argento  
PBS: soluzione tampone fosfato senza  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  (LONZA)  
PS: 100 U/ml penicillina/100 uM streptomicina Flaconi 100 mL 100x  
10.000 U/mL Pen, 10 mg/mL Strep (SIGMA)  
Red Oil  
Rosso neutro  
RPMI 1640 (LONZA)  
Trypan blue (SIGMA)  
STZ (streptozotocina): Boccetta da 1 g e 14 eppendorf da 1mL a 35mg/  
MI (SIGMA).  
TBE (FLUKA BIOKEMICA)  
Tiosolfato di sodio  
Trypsina/EDTA 0,05% / 0,02% in PBS (LONZA) Flaconi 100 mL 1x 0,5 g/  
L Try 0,2 g/L EDTA Sigma T3924  
Trizol (INVITROGEN)  
VEGF madre 10 µg/ml (SIGMA)  
Vectastain kit (VECTOR)  
Vybrant DiO cell labeling solution (INVITROGEN)

### 3.2 – Attrezzature

Agitatore Magnetico (T11CT)  
Autoclave (PBI)  
Baghetto Termostato (GRANT INSTRUMENTS)  
Bilancia (KERN 440-47; METTLER AE240)  
Camera di Neuer-Bauer  
Cappa a flusso laminare verticale (BIOHAZARD)  
Centrifuga (CENTRIFUGE 5810R EPPENDORF; BIORAD)  
Citofluorimetro Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter), con software CXP  
Deionizzatore a resine a scambio ionico  
Fabbricatore di ghiaccio  
Fotocamere digitali (CANON, LEICA)  
Frigoriferi: -4°C, -20°C, -80°C.  
Incubatore per colture cellulari (BINDER);  
Materiale autoclavabile multiuso: bisturi, pinzette, petri di vetro  
Materiale sterile monouso per colture cellulari (FALCON, CELLSTAR,  
CORNING, GREINER BIO-ONE, COSTAR, PBI, BIO-D plastipak,  
PECHINEY PLASTIC PACKAGING, SIGMA, NUNC): provette (15, 50  
ml), pipette sierologiche (25, 10, 5, 2, 1 ml), pasteur di vetro cottonate e  
non cottonate, filtro 0,20 µm, strainer 40 µl, siringhe, parafilm, piastre (6,  
24, 96 wells), fiasche (T25, T75, T175; T25 ultra low-attachment), fialini  
di 1 ml, puntali.  
Microonde  
Microscopio ottico ad emissione ultravioletta (LEITZ FLUOVERT)  
Microscopio ottico invertito (LEITZ DIAVERT)



Microscopio ottico (LEITZ SM-LUX)  
NEEGA-DF (Sistema di Frazionamento)  
Pipettatori  
Pompa aspirante  
Spettrofotometro  
Lettore glicemia e Strisce ACCU-Chek Active (ROCHE).  
Termociclatore per PCR (BIORAD);  
Transilluminatore UV  
Scintillatore SKATRON

### **3.3 – Allestimento di colture primarie e stipiti di MSC**

Le MSC possono essere facilmente isolate dalla frazione di cellule mononucleate di midollo osseo grazie alla loro capacità di aderire su plastica. La capacità di aderire su plastica è comune a diversi tipi di cellule, ma l'attività proliferativa delle MSC in terreni classici quali DMEM 10% FBS è particolarmente spiccata e conferisce alle cellule un vantaggio nell'espansione in coltura. L'isolamento da tessuti "solidi", quali membrana amniotica, corion, gelatina di wharton, polpa dentale, mucosa e sottomucosa intestinale, isole pancreatiche, risulta facilitato se si performano triturazioni meccanica e digestioni enzimatica sui tessuti, procedimenti atti a liberare le cellule dalla propria matrice e stimolare l'adesione alla plastica. Protocolli specifici sono stati adattati per ciascun tessuto. La selezione delle MSC in coltura può essere effettuata con trattamento di Tripsina/EDTA a tempi caratteristici per le MSC (4 minuti), o con clonaggio a singola cellula mediante semina in piastre multipozzetto a diluizione limite.

#### **3.3.1 - Isolamento**

##### **Midollo Osseo**

Prelievi di sangue midollare sono stati ottenuti previo consenso informato via agoaspirazione da cresta iliaca eseguita su pazienti sani. Il volume di ciascuna aliquota è stato diluito 1:4 con soluzione PBS, stratificato su FICOLL in una provetta da 15 ml a fondo conico e centrifugato per 30' a 1500 rpm. L'anello di mononucleate all'interfaccia tra FICOLL e plasma è stato raccolto e lavato per due volte in PBS mediante centrifugazione per 5 minuti a 1000 rpm. Il nuovo pellet è stato risospeso in 5 ml di DMEM 20%FBS. E' stata condotta una prima aderenza in fiasca mediante incubazione di 1h a 37°C e al 5% CO<sub>2</sub>. I monociti aderiscono per primi sulla plastica, il sovrannatante è stato dunque raccolto e nuovamente centrifugato per 5' a 1000 rpm. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di DMEM 20% FBS; 10ul di tale sospensione sono stati prelevati e uniti a 90 ul di soluzione di metilviolettto: sono state contate le cellule mononucleate. Le cellule sono state riseminate in ragione di 10<sup>6</sup> mononucleate su cm<sup>2</sup> di superficie di aderenza in fiasche T25 con 5 ml di DMEM al 20% FBS. Le fiasche sono state riposte in incubatore a 37°C e al 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 7 giorni sono state eliminate le

cellule non aderenti eliminando il terreno esausto e sostituendolo con DMEM al 10% FBS.

### **Polpa Dentale**

Terzi molari estratti da soggetti adulti sono stati ottenuti previo consenso informato. I molari sono stati ripuliti e lavati in soluzione fisiologica addizionata di antibiotici. Una incisione coronale è stata effettuata mediante fresa lungo la circonferenza del dente, fino in prossimità della polpa dentale. I denti sono stati trasferiti in laboratorio in soluzione fisiologica addizionata di antibiotici. I denti sono stati spezzati lungo l'incisione, la polpa esposta è stata estratta utilizzando pinze sterili. Il tessuto viene dunque triturato meccanicamente e risospeso in 1 mL di collagenasi IV 1mg/mL in DMEM. La digestione enzimatica procede per 30 minuti a 37°C. L'azione enzimatica viene inibita aggiungendo 1 mL di DMEM 20% FBS. Segue una centrifugazione di 5' a 1000 rpm. Il surnatante viene eliminato ed il pellet viene risospeso in 2 mL di DMEM 10% FBS. La sospensione così ottenuta viene seminata in piastre previamente incise per favorire l'adesione ed incubata a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### **Membrana Amniotica, Corion e Gelatina di Wharton della Placenta a termine**

Placente normali sono state ottenute da parti cesarei previo consenso informato. Le placente sono state trasferite rapidamente in laboratorio, lavate con PBS contenente penicillina e streptomina e utilizzate immediatamente. La membrana amniotica (AM) viene separata dal corion (COR) per trazione. La gelatina di Wharton viene resecata dal cordone ombelicale. Tali tessuti separatamente sono stati triturati meccanicamente e incubati per 10' in una soluzione di Trypsina-EDTA 1x e collagenasi IV 1mg/mL in rapporto 1:1, risospendendo vigorosamente per i primi 5' e lasciando sedimentare in incubatore a 37°C per il tempo rimanente. I sovrinatanti insieme con alcuni frammenti sono stati trasferiti in una nuova provetta e neutralizzati con FBS, quindi centrifugati a 1500 rpm per 10'. I pellet ottenuti sono stati risospesi in 5 ml di DMEM al 10% di FBS, seminati in fiasche T25 e posti in incubatore a 37°C e al 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 7 giorni sono state eliminate le cellule non aderenti eliminando il terreno esausto e sostituendolo con DMEM al 10% FBS.

### **Tessuti Intestinali**

Pezzi chirurgici di colon o intestino tenue sono stati ottenuti previo consenso informato da resezioni in pazienti con cancro al colon, oppure da resezioni di tratti intestinali di pazienti IBD (Crohn e Colite Ulcerosa). I pezzi sono stati trasferiti rapidamente in laboratorio e lavati con PBS contenente penicillina, streptomina ed antimicotico. La mucosa e la sottomucosa sono state separate per trazione meccanica e resecate. I tessuti, trattati separatamente, sono stati sminuzzati meccanicamente e trasferiti in una provetta da 15 mL con 1,5ml TrypsinaEDTA 1x e 1,5ml di collagenasi IV 1mg/mL. Segue una risospensione vigorosa per 6 minuti. Il digerito è stato incubato per 30' a 37°C, gli enzimi litici sono stati poi neutralizzati con 1,5ml FBS. Il sovrinatante insieme con alcuni frammenti è stato centrifugato a 1000 rpm per 10', il pellet ottenuto è stato risospeso in 5 ml di DMEM 20% FBS e seminato in fiasche T25.

### **Isole Pancreatiche**

La porzione di pancreas utilizzata per l'isolamento proviene da una porzione sana di resezione di neoplasie pancreatiche quali adenocarcinomi e tumori cistici neuroendocrini pancreatici. L'analisi di anatomia patologica controlla che i margini della porzione siano liberi dal tumore ed il pezzo viene, successivamente, trasportato attraverso mezzo di trasporto addizionato di antibiotici dalla sala operatoria al laboratorio.

La metodica di isolamento è una frammentazione meccanica e digestione enzimatica ed è messa a punto a partire dal protocollo di Gallo et. Al <sup>175</sup>. Il pezzo chirurgico viene pesato e tritato meccanicamente. Il tessuto sminuzzato si dispone, poi, in una provetta da 50 ml e si procede alla digestione enzimatica con collagenasi IV (1 mg/ml) in rapporto 17 : 1 rispetto al peso del tessuto. L'incubazione avviene in agitazione a 37° C per 1h 30'. Al termine dell'incubazione si ferma l'azione enzimatica con DMEM 10% FBS in rapporto 3:1 con il volume di digestione. Si centrifuga 5 min a 2000 rpm . Si contano le isole risospingendole in un volume noto di PBS e le si seminano ad una concentrazione di 50 islets/ cm<sup>2</sup> in DMEM 10% FBS o CHANG medium D.

### **3.3.2 - Espansione in coltura**

Dopo alcuni giorni di coltura, con controlli quotidiani al microscopio ottico invertito e cambi di terreno DMEM addizionato al 10% di FBS ogni tre giorni, le colture primarie così isolate hanno raggiunto la confluenza e sono state staccate dalle fiasche per essere seminate espanse su una superficie doppia.

Il protocollo di taglio prevede l'eliminazione dalle fiasche del terreno di coltura, il lavaggio della superficie con PBS e l'impiego di una soluzione proteolitica di Tripsina/EDTA 1x.

Dopo circa 4 minuti di incubazione a 37°C si osserva il distaccamento delle cellule di aspetto fibroblastico: si neutralizza immediatamente la tripsina aggiungendo un volume di DMEM al 10% di FBS pari o superiore al volume di soluzione proteolitica utilizzata. Tale risospensione viene centrifugata per 5 minuti a 1000rpm, si elimina il sovrantante contenente frammenti cellulari, eventuale matrice extracellulare e tripsina, si risospinge il pellet in 1 ml di DMEM 10%FBS. Viene eseguita una conta cellulare per mezzo della camera di Neuer-Bauer con colorazione vitale di Trypan Blue.

Mediante successivi tagli espansivi e propagazioni in coltura, gli stipiti possono essere espansi per numerosi passaggi. Il clonaggio a singola cellula può essere effettuato mediante semina in piastre multipozzetto a diluizione limite.

### 3.3.3 - Caratterizzazione immunofenotipica e citofluorimetria

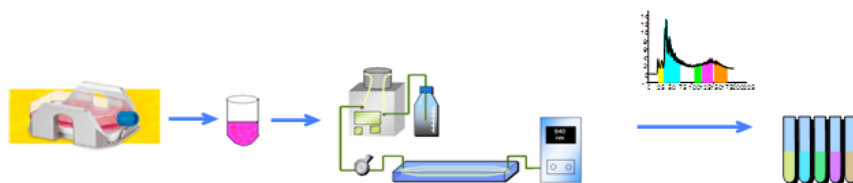
Il saggio al citofluorimetro consente di dare una caratterizzazione immunofenotipica alle colture. La fissazione si effettua incubando 10 min a T ambiente un pellet di almeno  $10^5$  cellule per saggio in una provetta da 15 ml in 100  $\mu$ l di fissativo Intraprep 1. Si procede con due lavaggi in PBS in successione: risospensione in 10 ml di PBS, centrifuga a 1000 rpm 5 min, eliminazione del sovrnatante. Si risospende il pellet in 500  $\mu$ l di PBS e si mantiene a 4°C. In caso di antigeni intracitoplasmatici si effettua una permeabilizzazione con Triton X100. Per ogni saggio le cellule vengono trattate con 1  $\mu$ l del rispettivo anticorpo per 45 minuti in ghiaccio e al buio. Le cellule vengono poi lavate due volte con PBS ed analizzate al citofluorimetro (raccolti  $10^4$  eventi per saggio) per gli anticorpi anti-: Oct-4, Nestina, Sca-1, SSEA-4, Stro-1, vWF, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, PanCK, HLA-I, HLA-II, c-Kit, insulina, glucagone. Gli anticorpi primari possono essere marcati con tracciante fluorescente (FITC o PE) o accoppiati ad un anticorpo secondario con tracciante fluorescente (FITC o PE).

I dati, raccolti con citofluorimetro Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter), vengono analizzati mediante il software CXP.

### 3.3.4 – Frazionamento in NEEGA-DF

Le strumentazioni specifiche per il frazionamento costituiscono un sistema:

- Riserva di fase mobile
- Pompa peristaltica Miniplus 3 (Gilson)
- Valvola di iniezione a "T"
- Elemento separatore (canale)
- Rilevatore UV/VIS
- PC per acquisizione dati



Schematizzazione del sistema di frazionamento in canale NEEGA-DF: le cellule vengono staccate dalla piastra di coltura, vengono sospese in una provetta, separate tramite il canale NEEGA-DF e le frazioni vengono raccolte in provette sterili; tutto il processo si svolge sotto cappa a flusso laminare, per mantenere le condizioni di sterilità.

Il frazionamento è stato condotto in condizioni di sterilità (cappa Biohazard BH-EN 2000 S7 di classe II a flusso laminare verticale).

Prima di dar luogo al frazionamento si condiziona il sistema, previamente sterilizzato, facendo passare la fase mobile (PBS addizionato di 0.1% BSA, 100U/ml penicillina e 100 $\mu$ M streptomicina) a temperatura ambiente con un flusso di eluizione di 0.5 ml/min per circa 30 minuti.

Le cellule vengono raccolte, contate, portate ad una concentrazione di 3.000.000 cells/mL e mantenute risospese. Nel dispositivo frazionatore vengono iniettati 50  $\mu$ l di sospensione cellulare (150.000 cellule). Il frazionamento è effettuato sfruttando un flusso continuo (portata di 0.5 ml/min) di fase mobile spinto da pompa peristaltica.

All'uscita del dispositivo di frazionamento, è collegato un rilevatore UV/Vis per monitorare il processo di eluizione. Per la raccolta delle cellule eluite, a valle dell'uscita del rilevatore è collegato un collettore di frazioni. In seguito ad un periodo relativamente breve di tempo dalla iniezione (circa 30 minuti), l'eluizione cellulare è completata.

### 3.4 - Differenziamenti *in vitro*

#### 3.4.1 - Differenziamento osteogenico

Le cellule si seminano, in piastre da 6 wells, alla concentrazione di 2000 cells/cm<sup>2</sup> in terreno normale (160 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) e si lasciano aderire per una notte. Il giorno successivo viene avviata l'induzione con cambi di terreno osteogenico (vedi tabella) ogni 3 giorni per 2 settimane. Parallelamente alle cellule indotte, cellule di controllo sono mantenute in coltura in terreno normale. L'avvenuto differenziamento viene analizzato mediante saggio istochimico di Von Kossa.

Componente	Concentrazioni
DMEM-H 15% FBS	
DEX	10 <sup>-8</sup> M
Acido ascorbico	50 $\mu$ g/mL
B-glicerolfosfato	3,5 mM

#### 3.4.2 - Differenziamento adipogenico

Le cellule si seminano in piastre da 6 wells alla concentrazione di 20000 cells/cm<sup>2</sup> in terreno normale (160 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) e si lasciano aderire per una notte. Il giorno successivo viene avviata l'induzione con cambio di terreno ogni 3 giorni per 2 settimane ed alternando il terreno di induzione al terreno di mantenimento (tabella). Parallelamente alle cellule indotte, cellule di controllo sono mantenute in coltura con terreno normale. L'avvenuto differenziamento viene analizzato mediante colorazione istochimica Red Oil.

Induzione	Concentrazioni
DMEM-H 10% FBS	
Indometacina	200 $\mu$ M
Insulina	20 $\mu$ g/ml
IBMX (3-isobutilmetilxantina)	0,5 mM
DEX (dexametazone)	1 $\mu$ M

Mantenimento	Concentrazioni
DMEM-H 10% FBS	
Insulina	20 $\mu$ g/ml

### 3.4.3 - Differenziamento angiogenico

Le cellule si seminano ad una concentrazione di 24000 cells/cm<sup>2</sup> in terreno normale (6000 cells/cm<sup>2</sup> i controlli), il giorno successivo vengono indotte per sette giorni con cambio di terreno ogni due giorni. Cellule utilizzate come controllo sono mantenute in coltura in DMEM 10 % FBS parallelamente alle cellule indotte. Le cellule aderenti in fiasca vengono recuperate e contate per l'analisi citofluorimetrica e per il saggio funzionale su Matrigel.

Composizione	Concentrazioni
DMEM 2% FBS	
VEGF	50 ng/ml

### 3.4.4 - Differenziamento condrogenico

Le cellule vengono recuperate e contate. Vengono allestite provette a fondo conico contenenti 5x10<sup>5</sup> cellule e 500  $\mu$ l di terreno di induzione come da tabella. Si centrifuga 5' a 1000 rpm.

L'induzione procede per quattro settimane con cambi di terreno di induzione completo ogni tre giorni. Al termine dell'induzione le cellule, in caso di risposta positiva, avranno formato un aggregato cartilagineo che viene fissato in formalina 10% ed incluso in paraffina per ottenere delle sezioni istologiche.

Composizione	Concentrazioni
DMEM	
DEX (dexametazone)	0,1 $\mu$ M
Sodio piruvato	1 mM
Acido ascorbico	0,17 mM
Prolina	0,35 mM
ITS-LA	1x
TGF- $\beta$ III	0,01 $\mu$ g/mL

### 3.4.5 - Differenziamento miogenico

Le cellule vengono recuperate, contate e seminate in fiasche T25 e in chamber slides in permax ad una concentrazione di 10000 su cm<sup>2</sup> per essere indotte 7 giorni oppure 5000 su cm<sup>2</sup> per essere indotte

quattordici giorni. Il terreno di induzione è così composto: DMEM 55%, MCDB 201 40%, FBS 5%, ITS-LA \* BSA100x, dexametasone  $10^{-8}$ M, acido ascorbico 2 fosfato  $10^{-4}$  M, b-FGF 10 ng/ml, VEGF 10 ng/ml, IGF-1 10 ng/ml (SIGMA). L'induzione procede per due settimane con cambi di terreno ogni tre giorni. Al settimo giorno dalle fiasche destinate alla coltura da 7 giorni vengono raccolte le cellule e viene estratto l'RNA. Le altre cellule verranno trattate analogamente al 14° giorno. Si smontano le chamber slides e si fissano le cellule in Acetone:Metanolo = 7:3 e i vetrini destinati a immunoistochimica mantenuti a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Gli RNA saranno saggiati grazie ad RT-PCR per verificare l'espressione dei geni *Myo-D* e *Myf-4* ("miogenina"), fattori di trascrizione muscolo-specifici. Sulle cellule fissate sarà analizzata per mezzo di saggi immunoistochimici la variazione nell'espressione delle proteine desmina ed  $\alpha$ -actinina, anch'esse marcatori miocitici utili per valutare l'eventuale commissionamento a muscolo scheletrico.

### 3.4.6 - Differenziamento pancreatico endocrino

Le cellule si seminano e si inducono al giorno 0 ad una concentrazione di 3000 cells/cm<sup>2</sup> in sei terreni di cui riportiamo la composizione in tabelle: (a) BJEE; (b) DMEM 2 % FBS; (c) EBRT; (d) EMBRYO; (e) STROM, (f) terreno normale di coltura CHANG. I cambi di terreno sono condotti ogni tre giorni.

BJEE	Concentrazioni
DMEM/F12 glucosio 8mM	
ITS	1x (tutte a 5mg/l)
$\beta$ -mercaptoetanolo	50 $\mu$ M
BSA	2 g/l
Nicotinammide	10 mM
EGF	10 ng/ml

EBRT	Concentrazioni
RPMI 1640 10% FBS	
Acido piruvico	1 mM
$\beta$ -mercaptoetanolo	50 $\mu$ M
HEPES	10 mM
b-FGF	20 ng/ml
EGF	10 ng/ml

EMBRYO	Concentrazioni
DMEM-H 2% FBS	
Activina A	10 ng/ml
$\beta$ -cellulina	10 ng/ml
b-FGF (aggiunto a 96h)	10 ng/ml

STROM	Concentrazioni
DMEM-H 10% FBS	
Nicotinammide	10 mM

BAGNARA	Concentrazioni
DMEM 10% FBS	
Nicotinammide	10 Mm
Activina A	10 ng/ml
Ε-cellulina	10 ng/ml

### 3.4.7 - RT- PCR

L'estrazione dell'RNA totale viene eseguita utilizzando il kit RNeasy (QUIAGEN) seguendo le istruzioni della casa produttrice. L'RNA estratto viene retrotrascritto e amplificato utilizzando primers sequenza-specifici (vedi tabella) grazie al kit ONE STEP RT-PCR (QUIAGEN) seguendo le istruzioni della casa produttrice sotto alle seguenti condizioni di amplificazione: 50°C per 30', 95°C per 15', 94°C per 30", TA (la temperatura di annealing è specifica per ogni coppia di primers) per 30", 72°C per 1' (39 cicli), 72° C per 10', 4°C.

I primers utilizzati sono:

Myo-D UTR left: 5'-AAG CGC CAT CTC TTG AGG TA-3'  
 Myo-D UTR right: 5'-GCG CCT TTA TTT TGA TCA CC-3'  
 (temperatura di annealing 60°C)

Miogenina left: 5'-AGG CTC AAG AAG GTG AAT GAG G-3'  
 Miogenina right: 5'-AGG TTG TGG GCA TCT GTA GGG T-3'  
 (temperatura di annealing 60°C)

b-actina left: 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3'  
 b-actina right: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'  
 (temperatura di annealing 57°C)

Gli amplificati vengono verificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 2%.

### 3.4.8 - Saggio istochimico di Von Kossa

Per rilevare il differenziamento osteogenico si esegue un saggio funzionale sulla deposizione di sali di calcio da parte delle cellule. I vetrini sono stati inizialmente fissati in etanolo, di seguito idratati e trattati per 10-15 minuti in una soluzione acquosa di nitrato di argento allo 0,5-1%, infine esposti alla luce ultravioletta. Sono stati sciacquati in acqua distillata, immersi per 5 minuti in una soluzione acquosa al 5% di tiosolfato di sodio e lavati in acqua corrente. I nuclei si colorano aggiungendo per 30 secondi una soluzione acquosa all'1% di rosso neutro. Infine sono stati montati i vetrini in mezzo acquoso, chiarificando in xilene e montando in resina sintetica. Fosfato e carbonato di calcio appaiono colorati in nero, i nuclei in rosso.



### **3.4.9 - Saggio istochimico Red Oil**

Per verificare il differenziamento adipogenico si esegue una colorazione istochimica mirata all'evidenziazione di vacuoli di lipidi neutri intracitoplasmatici. I vetrini sono stati colorati per 15 minuti nella soluzione colorante ottenuta mescolando 60 ml di una soluzione satura di Red Oil in isopropanolo (0,5g in 100 ml di isopropanolo a 98%) con 40 ml di una soluzione acquosa all'1% di destrina (al posto dell'acqua distillata). La soluzione è stata filtrata sotto vuoto dopo 10 minuti. Sono stati effettuati, quindi, due risciacqui sequenziali in isopropanolo al 60% e in acqua. Per la colorazione dei nuclei è stato impiegato l'emallume di Mayer. Infine, i vetrini sono stati trattati per 1 minuto con una soluzione all'1% di fosfato bisodico, lavati in acqua e montati in gomma sciroppo di Apathy. I lipidi neutri appaiono colorati in rosso e i nuclei in blu.

### **3.4.10 - Saggio di organizzazione su Matrigel**

Le cellule aderenti in fiasca vengono recuperate e contate per il saggio funzionale su Matrigel. In piastre da 96 pozzetti per ogni pozzetto necessario sono stati distribuiti 50 µl di Matrigel e si è lasciato incubare per 1h a 37°C. 5000 cells per pozzetto sono state seminate con DMEM senza FBS e diversi pozzetti sono stati variamente addizionati con 0ng/ml, 25ng/ml e 50 ng/ml di VEGF. Dopo 2, 4, 6 e 24 ore si valuta al microscopio ottico la formazione di strutture simili a capillari.

### **3.4.11 - Saggi immunoistochimici**

I saggi immunoistochimici vengono eseguiti utilizzando il kit Vectastain (VECTOR) seguendo le istruzioni dalla casa produttrice. Gli anticorpi primari vengono diluiti opportunamente in PBS e incubati per 30'. A seguire l'attacco dell'anticorpo secondario, la coniugazione con l'enzima perossidasi ne permette l'individuazione grazie alla deposizione di colore bruno come prodotto di perossidazione di un substrato cromogeno.

### **3.4.12 - Saggi di immunofluorescenza**

Saggi di immunofluorescenza indiretta sono stati effettuati su preparati fissati in paraformaldeide 4%. I preparati vengono lavati 2 volte in PBS per 3'. La permeabilizzazione viene condotta con Triton X100 0,1% ove necessario. Il blocco dei siti aspecifici viene condotta con PBS addizionato di BSA 1%. Gli anticorpi primari vengono diluiti opportunamente in PBS e incubati con i preparati overnight a +4°C. A seguire si performa un lavaggio in PBS e l'attacco dell'anticorpo secondario fluoresceinato, per 30' a 25°C. Si lava con PBS e si controcolorano i nuclei con DAPI. I vetrini vengono montati ed osservati in microscopia con luce ultravioletta.

### 3.5 – Prove di immunomodulazione

Il saggio di immunomodulazione prevede l'allestimento di coculture di MSC con cellule immunitarie attivate e la valutazione dell'attività proliferativa mediante rilevamento dell'incorporazione di timidina triziata. Le MSC vengono raccolte, contate, seminate in triplicato in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 2000 cellule per pozzetto in 100 ul di DMEM 10% FBS ed incubate a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule aderiscono nel giro di due ore. In questo lasso di tempo è stata effettuata la separazione delle cellule mononucleate da sangue periferico attraverso gradiente di densità su Ficoll. Le cellule mononucleate recuperate sono state contate e seminate sulle MSC adese ad una concentrazione di 20000 cellule per pozzetto (rapporto 10 mononucleate : 1 MSC) in ulteriori 100 ul di DMEM 10% FBS. Sono stati allestiti pozzetti di controllo di proliferazione: colture singole di mononucleate e colture singole di MSC. E' stata aggiunta fitoemoagglutina (PHA) ad una concentrazione di 10 ug/ml sul volume finale. La PHA è una lectina estratta dal fagiolo in grado di attivare policlionalmente i linfociti T ed indurre la proliferazione. La cocoltura viene mantenuta a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Dopo 68 ore dall'avvio della cocoltura viene aggiunta nel terreno di coltura timidina triziata, la quale viene incorporata nelle catene nascenti di DNA nelle cellule proliferanti. Trascorse quattro ore di incubazione con timidina triziata, le piastre vengono trasferite a -20°C per la lisi le cellule. Dopo aver riportato le piastre di coltura a temperatura ambiente viene trasferito il contenuto dei singoli pozzetti in filtri per il DNA, i filtri posizionati in provette e trattati con Soluene per 30' per il trasferimento in soluzione del DNA legato. Le soluzioni così ottenute vengono trasferite allo scintillatore SKATRON per la lettura dell'emissione. I dati di emissione radioattiva vengono raccolti ed elaborati a computer.

### 3.6 – Coculture con linee epiteliali

Sono state allestite coculture di cellule mesenchimali con cellule di linee tumorali epiteliali di colon (Caco-2 ed HT-29) per studiare le interazioni e le eventuali organizzazioni architetturali. Cellule delle linee Caco-2 e HT-29, e le MSC (intestinali mucosali, intestinali sottomucosali, da membrana amniotica e da midollo osseo) sono state contate e risospese ad una concentrazione di 300000 cellule/mL in DMEM 10% FBS.

Per le coculture su plastica sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti 50 ul di sospensione di cellule stromali e 50 ul di sospensione di linee epiteliali, sono quindi stati aggiunti 300 ul di DMEM 10% FBS.

Per le coculture in collagene, in ogni pozzetto di chamber slides da 8 pozzetti sono stati dispensati 120ul di sospensione di cellule stromali e 80 ul di sospensione di linee epiteliali, il tutto è stato mantenuto a freddo in ghiaccio ed in agitazione per alcuni minuti. 60 ul di collagene Megacult a 4°C sono stati aggiunti in ogni pozzetto, risospendendo abbondantemente. La soluzione con sospensione cellulare prende consistenza in pochi minuti e gelifica completamente nel giro di 1 ora a 37°. Sopra al gel vengono poi aggiunti 200 ul di DMEM 10% FBS.

Le coculture mantenute a 37°C 5% CO<sub>2</sub> hanno ricevuto cambi di terreno ogni due giorni per la prima settimana e quotidianamente per la

seconda. Tali coculture vengono mantenute in incubazione per 14 giorni.

Le coculture in collagene sono state fissate in glutaraldeide ed incluse per l'analisi in microscopia elettronica a trasmissione.

### **3.7 - Formazione di aggregati isola simili (ILCs)**

Gli ILCs vengono ottenuti seminando 400.000 cellule in 4 ml di terreno in fiasche T25 Ultra low attachment. Gli aggregati ILCs si formano entro 12 ore dalla semina. Si recupera la sospensione e la si lascia decantare 4 minuti in provette da 15 mL; gli ILCs precipitano sotto azione della gravità, quindi si recuperano prelevando 1 mL di terreno dal fondo della provetta.

### **3.8 - Marcatura per *in vivo cell tracking***

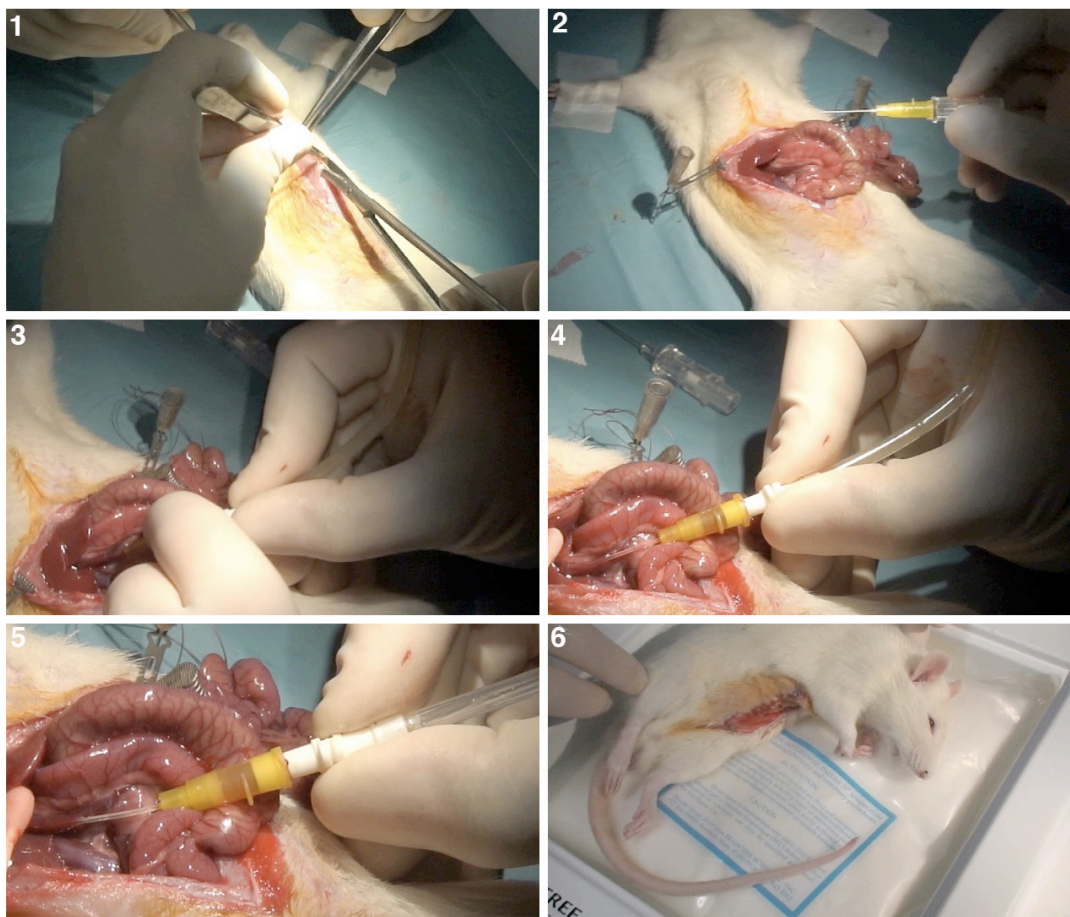
Le cellule in coltura vengono raccolte e contate. Viene preparata la soluzione colorante aggiungendo a 3 ml di DMEM il marcatore fluorescente verde DiO (5 $\mu$ l/ml). 5x10<sup>6</sup> cellule vengono risospese nella soluzione colorante. Si incuba a 37°C per 15 minuti. Si eseguono tre lavaggi in 10 mL di DMEM puro ed uno in 10 mL di HBSS al 2% di siero di ratto. Aggregati ILC possono essere ottenuti coltivando overnight e cellule marcate in fiasche ultra-low attachment. Infine le cellule vengono risospese in 700  $\mu$ L di soluzione costituita dall'80% di HBSS e 20% di siero di ratto, e questo volume viene trasferito in camera operatoria per l'infusione nell'animale trattato.

### **3.8- Trapianto *in vivo* in ratti STZ-diabetici**

Strutture isola-simili sono state ottenute da cellule staminali insulari pancreatiche o da BM-MSC, marcate con DiO mediante induzione *in vitro* ed aggregazione in piastre a minima adesione. Vengono utilizzati 16 ratti maschi di razza Lewis singenici di peso compreso tra 250 e 300 grammi. 4 ratti costituiscono il gruppo dei controlli sani. 12 ratti sono resi diabetici mediante una singola iniezione intraperitoneale di streptozotocina (65 mg/kg): il giorno successivo all'iniezione è valutata la glicemia serale e sono considerati diabetici i ratti con valori glicemici > 250 mg/dl per tre giorni consecutivi. 4 animali diabetici ricevono il trapianto di cellule pancreatiche, 4 di cellule di midollo, 4 costituiscono il gruppo degli animali diabetici non trapiantati.

Procedura chirurgica: dopo anestesia i.p. con Equitensina si procede a laparotomia mediana e, previo clampaggio dei rami portal per i lobi epatici medio e sinistro, ad incannulamento della vena porta e ad iniezione delle strutture isola-simili

risospese in soluzione HBSS 20% Siero di ratto. Al termine dell'infusione in vena porta si procede ad emostasi mediante applicazione di tampone sul punto di iniezione per circa un minuto e, dopo avere accertata l'avvenuta emostasi, viene eseguita la sutura in due strati della parete addominale. Si procede inoltre alla valutazione di un gruppo di ratti diabetici sham-operated: si segue la medesima procedura chirurgica ma è infusa solamente soluzione fisiologica.



Sequenza dell' operazione chirurgica: Laparotomia mediana (1); Clampaggio lobi sinistro e medio (2); inserimento cannula flessibile in vena porta e connessione con sospensione di ILCs (3) Trapianto in vena porta, flusso diretto ai i lobi destro e caudato (4,5); Emostasi, sutura e risveglio (6)

La funzionalità delle strutture isola-simili è valutata tramite controllo glicemico dei ratti appartenenti a entrambi i gruppi sperimentali eseguendo prelievi di sangue dalla vena caudale ogni 2-3 giorni per i primi 14 giorni post-trapianto. Nel corso dello stesso periodo sono registrati, inoltre, il consumo di acqua e la variazione ponderale dei ratti.

Dopo due settimane dal trapianto i ratti sham e diabetici vengono sacrificati mediante anestesia generale fino all'arresto respiratorio indotto dal Forane. I tessuti vengono perfusi per via intracardiaca con PBS e fissati con Paraformaldeide 4%.

I lobi epatici, il pancreas, i bulbi oculari ed i reni vengono prelevati, mantenuti a +4°C in fissativo Paraformaldeide 4% e preparati in criosezioni.

Viene eseguita una indagine istologica mediante microscopia a fluorescenza per il tracciante DiO, immunofluorescenza ed immunoistochimica (beta-2-microglobulina umana, mitocondrio umano, insulina umana, glucagone umano) al fine di valutare l'attecchimento ed il differenziamento delle strutture isolasi-mili trapiantate nel tessuto epatico.

### **3.10- Considerazioni etiche**

Tutti i tessuti sono ottenuti previo consenso informato e in accordo con le direttive del comitato etico ospedaliero del Policlinico Universitario Sant'Orsola-Malpighi. Tutti i tessuti sono anonimizzati all'arrivo presso il nostro laboratorio, registrati in base alla data ed alla tipologia del prelievo. Il midollo osseo è ottenuto da agoaspirazioni da pazienti sani, si tratta di una aliquota prelevata immediatamente a posteriori della donazione per trapianto. I terzi molari sono tessuti di scarto ottenuti da pazienti che si sottopongono all'estrazione. Le placenti derivano da parti cesarei a termine di donatrici sane, sono anch'esse considerate tessuto di scarto. I tessuti intestinali sono ottenuti da resezioni chirurgiche per cancro o per IBD. I tessuti pancreatici sono ottenuti da resezioni chirurgiche per cancro. Le cellule isolate non sono e non possono essere utilizzate per scopi diversi da quelli di ricerca. Le procedure non hanno alcun significato terapeutico. Il materiale biologico viene mantenuto vitale o criogenizzato a lungo termine. Il soggetto donatore può richiedere informazioni sul materiale biologico donato in qualunque momento, facendo riferimento alla data ed alla tipologia del prelievo. Non esiste rischio biologico per il donatore: il materiale viene trattato *ex vivo*. Le colture cellulari, le metodologie e le conoscenze ottenute mediante studi sui tessuti donati diventano patrimonio materiale ed intellettuale dell'Università di Bologna e possono essere rese di pubblico dominio. Il donatore non ottiene benefici diretti da questa donazione. Non esiste né un compenso né costi per la partecipazione del donatore alla ricerca. L'identità del donatore è trattata in riservatezza. I risultati dello studio possono essere pubblicati per ragioni scientifiche ma non sono accompagnati dal nome né da alcuna referenza che permetta di identificare il donatore.

## 4 – Risultati e Discussione

### 4.1 – Popolazioni simili alle MSC possono essere isolate da molteplici sorgenti

Sono state isolate popolazioni cellulari simili alle MSC da ciascuna sorgente analizzata. Sono stati allestiti almeno 6 stipiti da individui diversi per ciascuna tipologia di sorgente.

Gli stipiti saranno riferiti come segue:

MSC da midollo osseo: BM-MSC

MSC da gelatina di Wharton del cordone ombelicale: WJ-MSC

MSC da membrana amniotica: AM-MSC

MSC da corion: COR-MSC

MSC da polpa dentale: DP-MSC

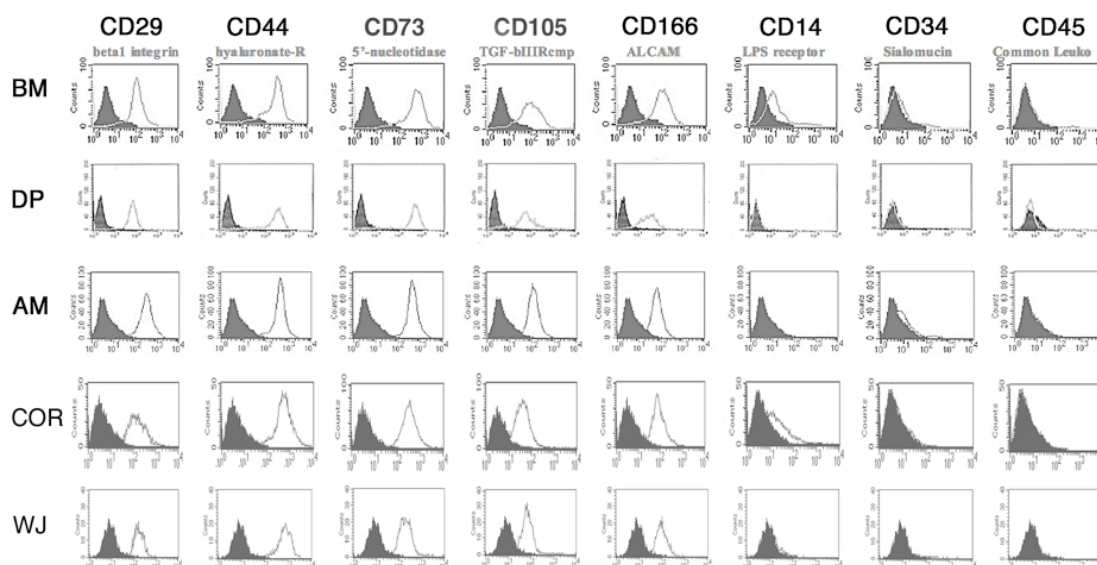
MSC da tonaca mucosa intestinale: IM-MSC

MSC da tonaca sottomucosa intestinale: ISM-MSC

Cellule MSC-simili da isole pancreatiche: PI-MSC-like

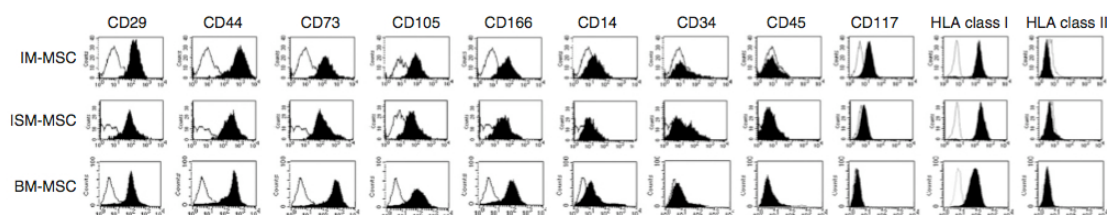
### 4.2 - Gli immunofenotipi evidenziano caratteristiche comuni e specificità legate alla sorgente

Le cellule selezionate in coltura *in vitro* sono state analizzate immunofenotipicamente mediante citometria a flusso. E' stata valutata la presenza o l'assenza di antigeni di superficie utilizzando una serie di anticorpi monoclonali, un pannello comunemente utilizzato per la caratterizzazione delle BM-MSC. Le popolazioni mostrano profili molto simili, come mostrato in figura.



**Comparazione dell'immunofenotipo delle MSCs derivanti da midollo osseo (BM), polpa dentaria (DP), membrana amniotica (AM), corion (COR), gelatina di Wharton (WJ).**



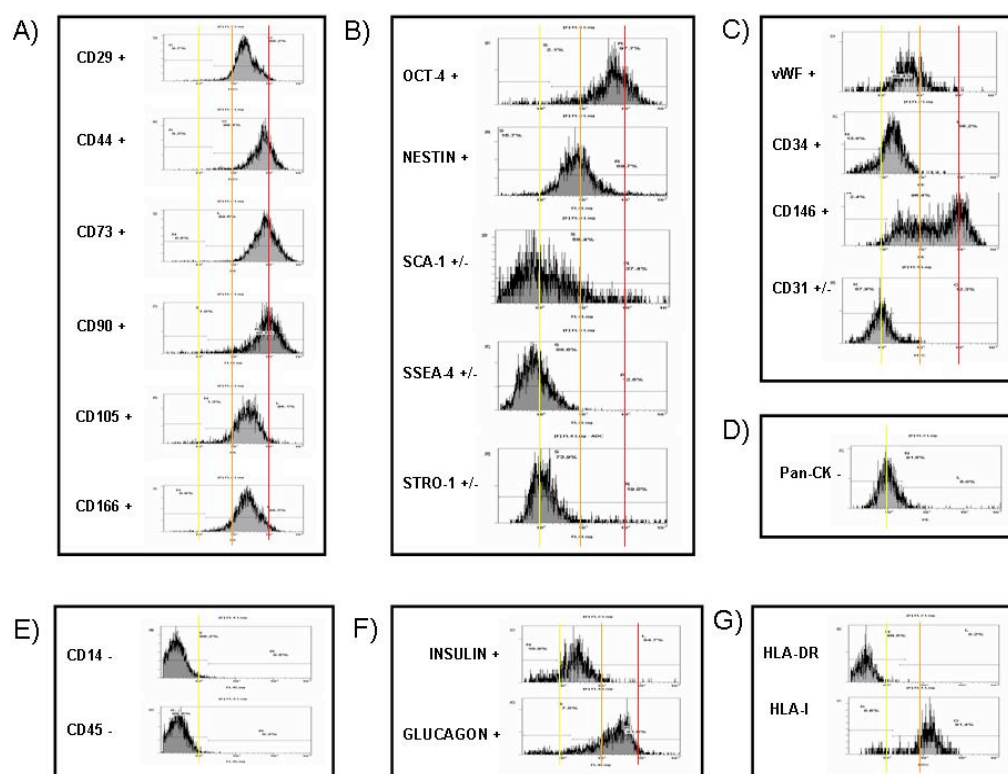


**Comparazione dell'immunofenotipo delle MSCs derivanti da mucosa intestinale (IM-MSC), sottomucosa intestinale (ISM-MSC) e midollo osseo (BM).**

Le popolazioni appaiono omogeneamente positive per l'espressione di CD29, CD44, CD73, CD105, e CD 166, omogeneamente negative per l'espressione di CD14 e CD 45. Esiste una certa variabilità nei livelli di espressione, anche tra campioni derivanti dalla stessa sorgente. Alcune peculiarità sono però degne di nota, poichè riscontrate come caratteristiche della sorgente.

Le popolazioni derivanti da mucosa intestinale (IM-MSC) sono apparse debolmente positiva per CD117, ovvero c-kit (il recettore per SCF). Questa molecola, oltre ad essere considerata un marcatore di staminalità, gioca un ruolo importante nei progenitori dello stroma intestinale: le cellule c-kit+ stromali coliche sono infatti considerate cellule progenitrici neuro/muscolari, e sono imparentate con le cellule interstiziali di Cajal; il c-kit è inoltre un marker utilizzato per la diagnosi dei tumori GastroIntestinali Stromali, GIST (nel 90% dei casi il tumore mostra una mutazione *gain of function* nel gene del c-kit in grado di portare ad una proliferazione incontrollata). Le popolazioni derivate dalla tonaca sottomucosa mostrano frequentemente sottopopolazioni debolmente positiva per il CD34 – un altro marcatore considerato per la diagnosi dei tumori GIST.

Le popolazioni di cellule simili alle MSC ottenute da isole pancreatiche (PI-MSC-like) meritano una trattazione a parte. Come visibile dal pannello riportato in figura, queste cellule mostrano positività ai markers mesenchimali CD29, CD44, CD73, CD105, CD166 ( riquadro A) e sono negative per CD14 e CD45 ( riquadro E). Le cellule appaiono debolmente positive per il marcatore CD34, in maniera dissimile alle BM-MSC. Le popolazioni mostrano livelli molto elevati di espressione dei marcatori di staminalità quali Oct-4 e Nestina, oltrechè livelli non trascurabili di SCA-1, SSEA-4 e STRO-1 ( riquadro B). Questi progenitori mostrano espressione basale di insulina e glucagone ( riquadro F), il che indica una relazione con le cellule endocrine competenti. Inoltre, queste cellule mostrano un fenotipo che le accomuna con tipi cellulari endoteliali/pericitici, essendo positive per vWF, CD34, CD90, CD105, CD146, e debolmente per CD31 ( riquadri C, A). Le colture non appaiono contaminate da epitelio esocrino (PanCK-, pannello D).



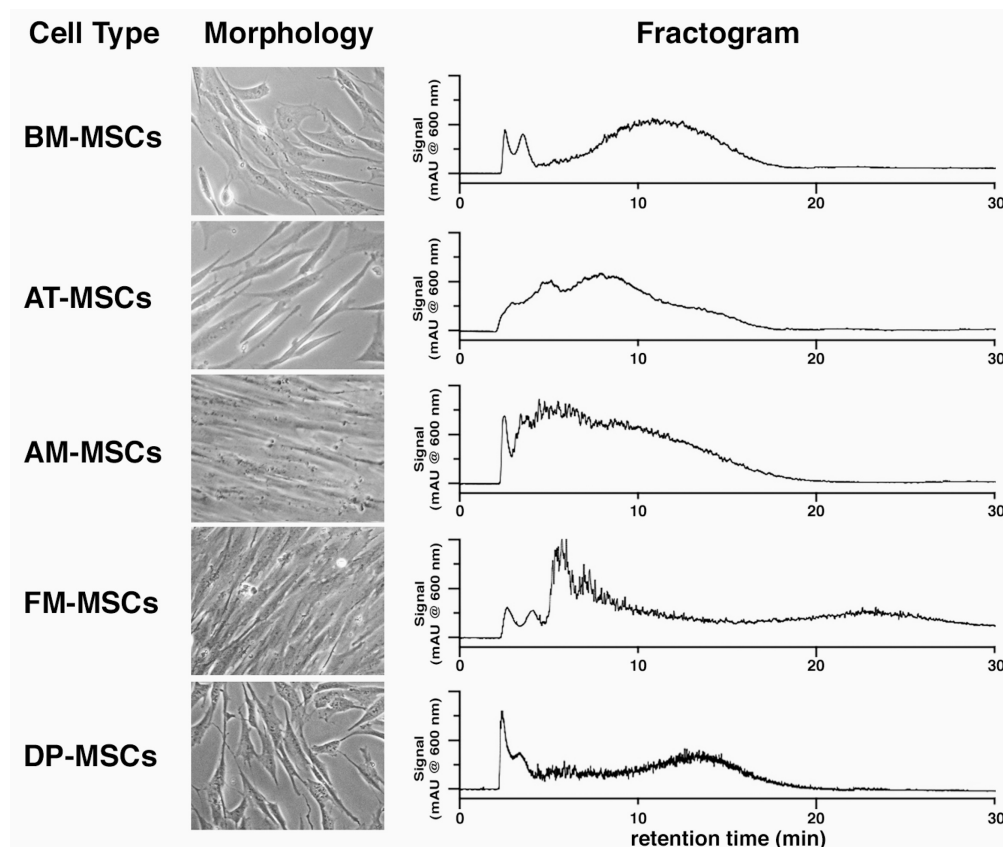
Analisi al citofluorimetro di colture PI-MSC-Like al 5° passaggio. Il pannello A riporta markers mesenchimali; il pannello B markers associati con lo stato di staminalità; il pannello C markers endoteliali; il pannello D il marker epiteliale utilizzato; il pannello E markers ematopoietici; il pannello F markers endocrini; il pannello G gli HLA.

### 4.3 Il frazionamento delle popolazioni in NEEGA-DF evidenzia profili frattografici specifici per ciascuna sorgente

Il grafico ottenuto in seguito al frazionamento nel sistema NEEGA-DF descrive l'andamento dell'eluizione del campione introdotto. Esso risulta costituito da un primo picco caratterizzato da un tempo di ritenzione di circa 3 minuti, rappresentante il *volume morto* (*void*), che indica l'eluizione di tutti i componenti non ritenuti, quali proteine e frammenti di acidi nucleici.

A tempi di ritenzione maggiori compare un secondo picco tipico dello specifico campione iniettato. Le MSC da differenti sorgenti mostrano profili diversi ma caratteristici della sorgente. Queste differenze dipendono da proprietà biofisiche quali la densità, il volume, le caratteristiche della superficie, acquistate dinamicamente dalle cellule nel separatore NEEGA-DF.





Morfologia e Frattogrammi di popolazioni di MSC da diverse sorgenti. MSC da midollo osseo (BM-MSCs); da tessuto adiposo (AT-MSCs), membrana amniotica (AM-MSCs); da corion di membrane fetali (FM-MSCs); da polpa dentale (DP-MSCs).

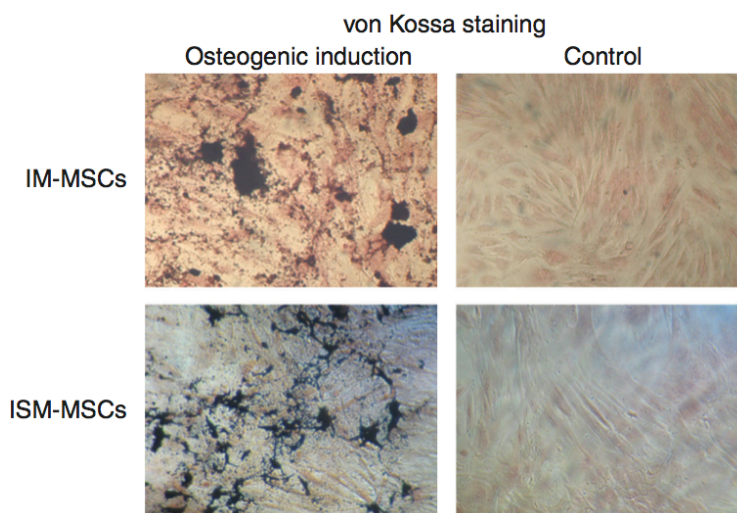
I profili frattografici potenziano la caratterizzazione delle popolazioni. A fronte di immunofenotipi simili, le popolazioni potrebbero essere molto dissimili per caratteristiche biofisiche, come evidenziato dai profili frattografici.

## 4.4 – Il potenziale differenziativo *in vitro* delle MSC dalle diverse sorgenti non è sovrapponibile

### 4.4.1 - Differenziamento osteogenico

Le popolazioni di BM-MSC, AM-MSC, COR-MSC, WJ-MSC, DP-MSC, IM-MSC ed ISM-MSC mostrano potenzialità differenziativa osteogenica *in vitro*. Le cellule derivanti da midollo osseo rispondono con una più rapida alterazione morfologica ed una estensiva deposizione di matrice mineralizzata: le ragioni di una potenzialità differenziativa così spiccata sono con ogni probabilità collegate alla sorgente tissutale.

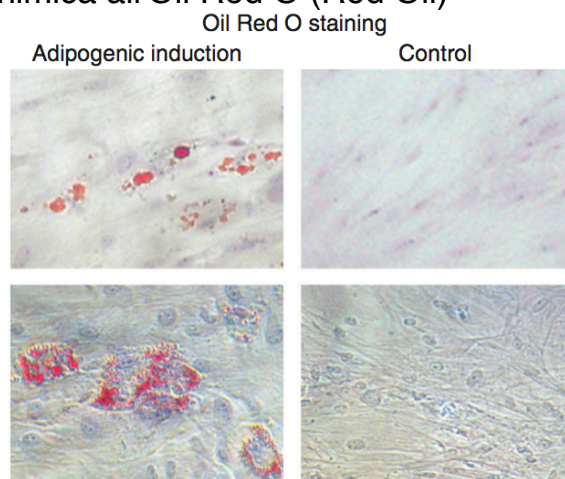
Le popolazioni derivate da tessuti pancreatici non appaiono differenziare verso fenotipi mineralizzanti con il protocollo riportato.



Esempi di differenziamento osteogenico di MSC intestinali. La deposizione di matrice mineralizzata risulta in una reazione positiva alla colorazione istochimica di Von Kossa.

#### 4.4.2 - Differenziamento adipogenico

Tutte le popolazioni testate hanno mostrato potenzialità differenziativa adipogenica. L'aspetto differenziato è però molto diverso tra le popolazioni e varia da quello delle cellule BM-MSC, che aumentano di dimensioni e si riempiono di grossi vacuoli di grassi saturi, a quello delle DP-MSC e delle IM-MSC, che accumulano poche goccioline lipidiche di piccole dimensioni. L'avvenuto differenziamento è visibile mediante la colorazione istochimica all'Oil Red O (Red Oil)-

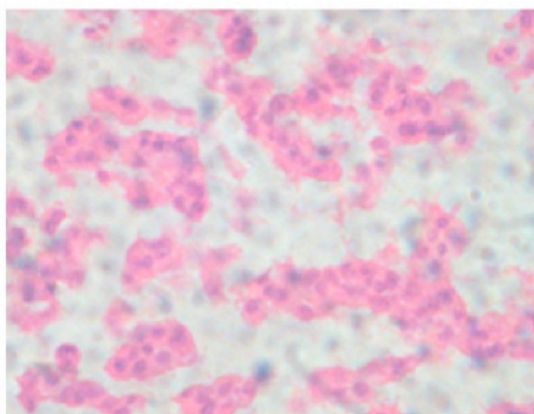


Esempi di differenziamento adipogenico: IM-MSC ed ISM-MSC

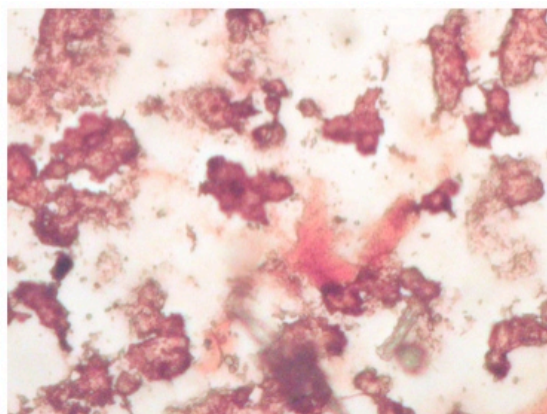
#### 4.4.3 - Differenziamento condrogenico

Cellule derivate da midollo osseo, da membrana amniotica, da corion, da gelatina di Wharton e da polpa dentale hanno generato bottoncini integri e consistenti di cartilagine ialina con abbondante matrice cellulare e con deposizione di collagene.

Le cellule di derivazione intestinale hanno formato aggregati compatti, che risultavano però negativi al collagene II. E' possibile che vengano espresse in queste cellule delle forme di collagene specifiche del tessuto di origine, non riconosciute dal nostro anticorpo. Le cellule pancreatiche in terreno condrogenico non hanno formato aggregati compatti.



Ematossilina-Eosina



IHC per Collagene II

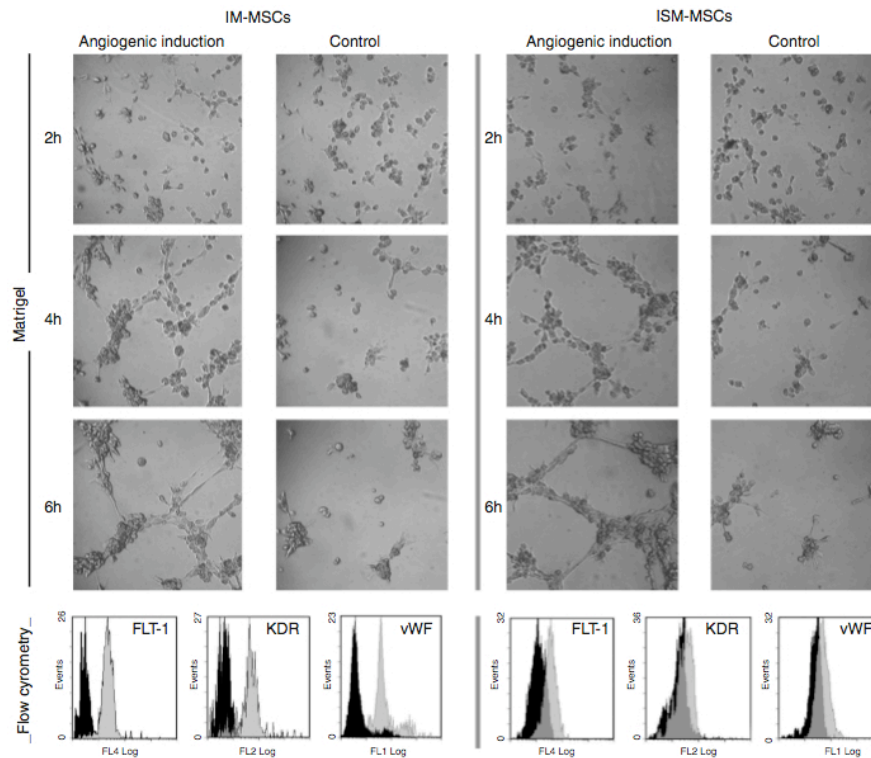
Esempio di sezione istologica di bottone cartilagineo ottenuto da AM-MSCs.

#### 4.4.4 - Differenziamento angiogenico

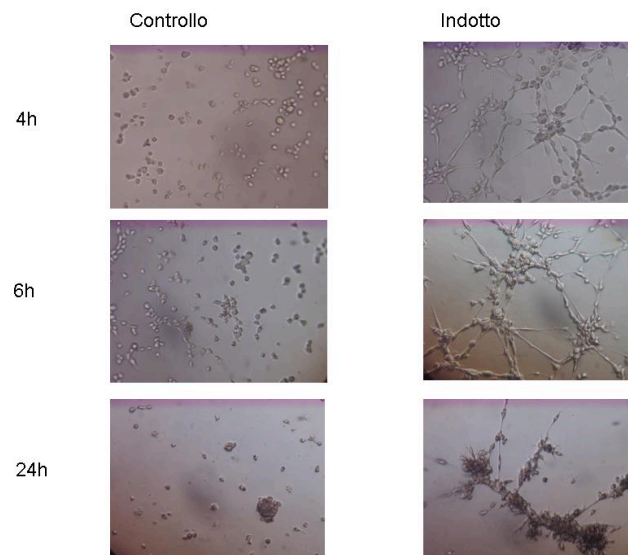
Cellule BM-MSCs, AM-MSCs, IM-MSCs, ISM-MSCs e PI-MSCs-Like hanno mostrato potenzialità differenziativa angiogenica *in vitro*, acquisendo o potenziando la capacità funzionale di organizzarsi in strutture simili ai capillari su Matrigel, ed aumentando i livelli di espressione di marcatori endoteliali, quali vWF, FLT-1, KDR, CD34.

Le cellule di membrana amniotica sono apparse in grado di organizzarsi in strutture tube-like su Matrigel anche in assenza della stimolazione con VEGF. L'immunofluorescenza per valutare l'espressione del vWF ne mostra la comparsa in seguito all'induzione, in strutture granulari che potrebbero precorrere i corpuscoli di Weibel-Palade.

Le cellule di origine pancreatica seminate su Matrigel in assenza di induzione angiogenica si aggregano autonomamente in aggregati compatti: si tratta di strutture molto diverse da quelle capillari-simili, che sono invece evidenziabili nelle stesse popolazioni dopo stimolazione angiogenica.



Esempi di differenziamento angiogenico di colture di derivazione intestinale. Le cellule indotte si organizzano in strutture tube-like ed aumentano l'espressione di marcatori endoteliali.

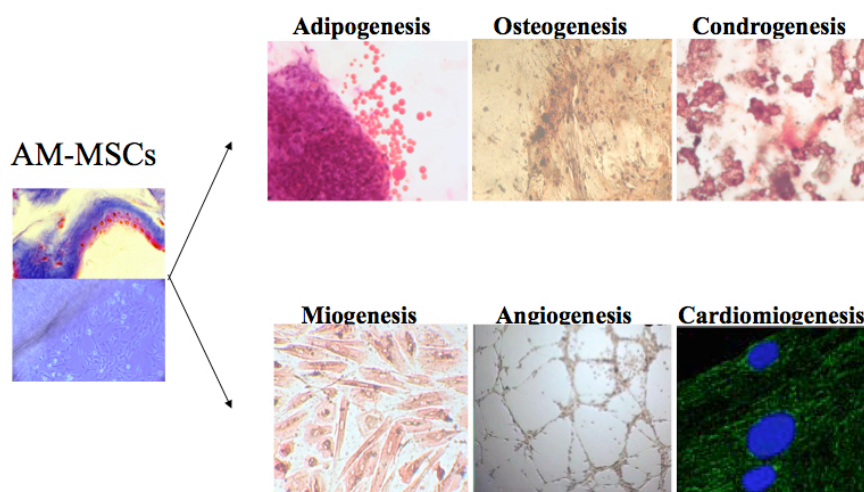


Saggio funzionale su Matrigel per cellule derivate da isole pancreatiche. Le popolazioni cellulari di controllo mostravano una spontanea attività migratoria ed una tendenza a formare aggregati compatti. Le cellule indotte si dispongono in cordoni con un numero maggiore di contatti; le cellule disperse sono rare. Alle 24 h le strutture simili a capillari delle popolazioni indotte si mantengono stabili.

#### 4.4.5 – Multipotenzialità differenziativa di AM-MSCs

Tra le sorgenti studiate, la Membrana Amniotica emerge come una delle più interessanti. Le cellule contenute nei tessuti della placenta a termine possiedono una età biologica di soli 9 mesi dalla formazione dello zigote, si trovano in prossimità dell'interfaccia materno-fetale - un “santuario immunologico” ed un ambiente protetto da insulti. Si tratta di tessuti considerati di scarto, ampiamente disponibili, ed il cui utilizzo è libero da problematiche etiche. Così come il recupero di staminali ematopoietiche da sangue cordonale, anche il prelievo di MSC da placenta a termine è una procedura ad “invasività zero”. Se venisse effettuato bancaggio su larga scala si potrebbe disporre di cellule con elevato grado di compatibilità per finalità di utilizzo allogenico, o addirittura di cellule per utilizzo autologo.

Le AM-MSCs appaiono molto simili alle BM-MSCs, e mostrano un vasto potenziale differenziativo *in vitro*.



Differenziamenti verso fenotipi di derivazione mesenchimale di AM-MSCs

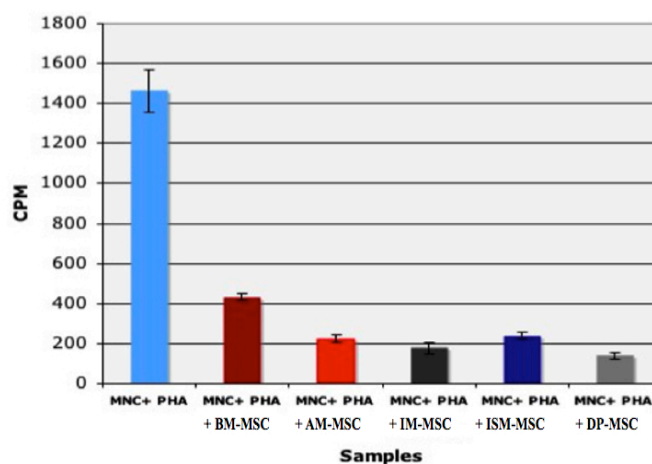
#### 4.5 - MSC da diverse sorgenti possiedono attività immunomodulatorie soppressive

L'effetto immunomodulatorio soppressivo di MSC da diverse sorgenti è stato evidenziato in esperimenti di cocoltura delle MSC con cellule mononucleate da sangue periferico (MNC, o PBMC).

BM-MSCs, AM-MSCs, DP-MSCs, IM-MSCs, ISM-MSCs da pazienti sani risultano in grado di modulare in senso negativo la proliferazione di MNC stimulate policlionalmente con PHA. I dati, ottenuti mediante misurazione dell'incorporazione di timidina triziata nelle coculture, mostrano un abbattimento della proliferazione mediato dalle MSC. Esiste



variabilità intersperimentale, forse collegata con le responsività dei diversi preparati di mononucleate da donatori.



Lo stroma midollare costituisce il microambiente per il mantenimento delle cellule staminali emopoietiche, e gioca l'importante ruolo di generare una barriera immunologica a protezione di tale pool. I nostri esperimenti confermano l'attività immunomodulatoria delle popolazioni di MSC derivanti da midollo osseo. Abbiamo osservato una diminuzione nell'efficienza immunosoppressiva col progredire dei passaggi e dell'età della coltura. La capacità di inibire la risposta immunitaria potrebbe correlare inversamente con l'età della popolazione cellulare, questo evidenzerebbe il valore aggiunto delle MSC derivanti da annessi fetali: la giovane età naturale di tali cellule, con l'estensiva potenzialità proliferativa, potrebbe sostenere a lungo l'attività di modulazione dell'immunità. Gli annessi embrionali costituiscono l'interfaccia e la barriera tra madre e figlio in natura: sono gli effettori del mantenimento di un "santuario immunologico", in grado di disattivare la risposta immunitaria materna che potrebbe rivolgersi pericolosamente contro gli antigeni del nascituro. Una tolleranza immunologica deve anche realizzarsi a livello della mucosa e della sottomucosa intestinale: in questo sito infatti è di vitale importanza il mantenimento di uno stato infiammatorio persistente, per il confronto con i microorganismi simbiotici, ma minimo, per non danneggiare l'epitelio mucosale continuamente impegnato nell'assorbimento di nutrienti dal mondo antigenico esterno.

#### 4.6 – L'effetto immunomodulatorio soppressivo correla con i livelli di produzione di HLA-G

Nell'ambito dei nostri studi sull'attività immunosoppressiva, è risultato evidente che diversi preparati di BM-MSC possiedono importanti differenze nella potenza dell'effetto immunomodulatorio. Le BM-MSC vengono già impiegate in trial clinici per la terapia di patologie immuno-mediate, quali ad esempio la GvHD. Al momento i dosaggi sono programmati solo in base al numero di cellule. Sarebbe opportuno che si valutasse il parametro dell'effetto immunosoppressivo a priori di ogni trapianto, per poter determinare la dose di MSC da trapiantare in base alla funzionalità desiderata. Le tecniche per la valutazione dell'effetto soppressivo richiedono tecnologie ed esperienza di cui solo alcuni

laboratori dispongono. Abbiamo dunque investigato l'espressione di molecole coinvolte con questa funzionalità, alla ricerca di marcatori biologici per una più rapida e semplice valutazione. I risultati più interessanti sono stati ottenuti valutando la produzione di forme solubili e di membrana di HLA-G: i livelli di produzione correlano infatti direttamente con la potenza dell'attività soppressiva sulla proliferazione di PBMC+PHA.

Le molecole HLA-G potrebbero essere dunque utili marcatori per la determinazione a priori del dosaggio o per la scelta delle preparazioni candidate al trapianto.

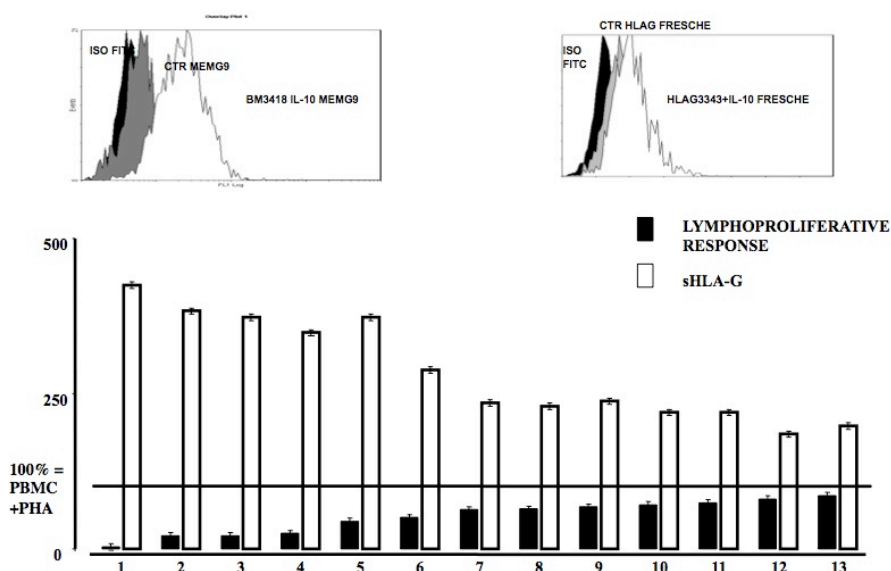
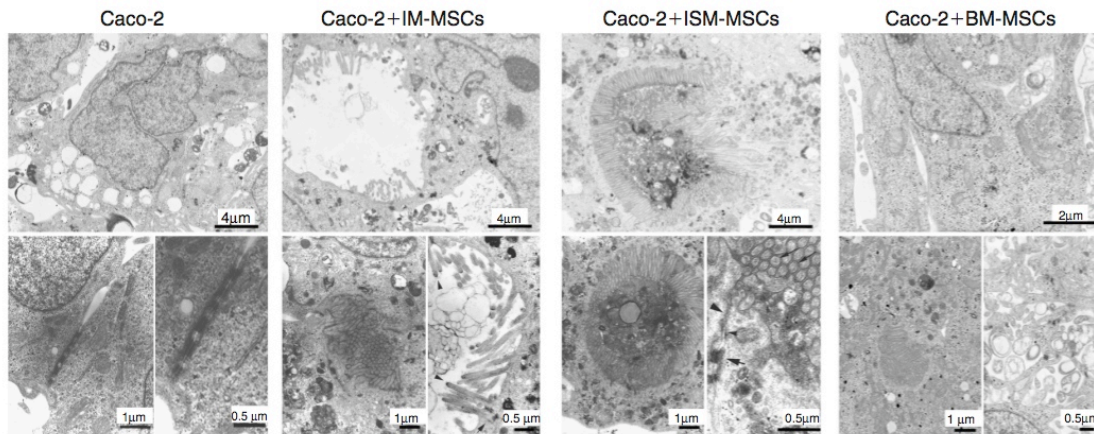


Grafico che associa l'effetto soppressivo sulla proliferazione con la produzione di molecole HLA-G. La risposta proliferativa residua percentuale in coculture PBMC+PHA+MSC, in confronto al 100% della proliferazione delle sole PBMC+PHA, è indicata dai blocchi neri. L'aumento di produzione di HLA-G solubile percentuale, riferito al 100% della proliferazione delle sole PBMC+PHA, è indicato dai blocchi bianchi. Nei riquadri superiori sono mostrati gli istogrammi citofluorimetrici per mHLA-G delle BM-MSC dello stipite 1, alto esprime di HLA-G nelle forme di membrana e solubile, e dello stipite 11, basso esprime di HLA-G.

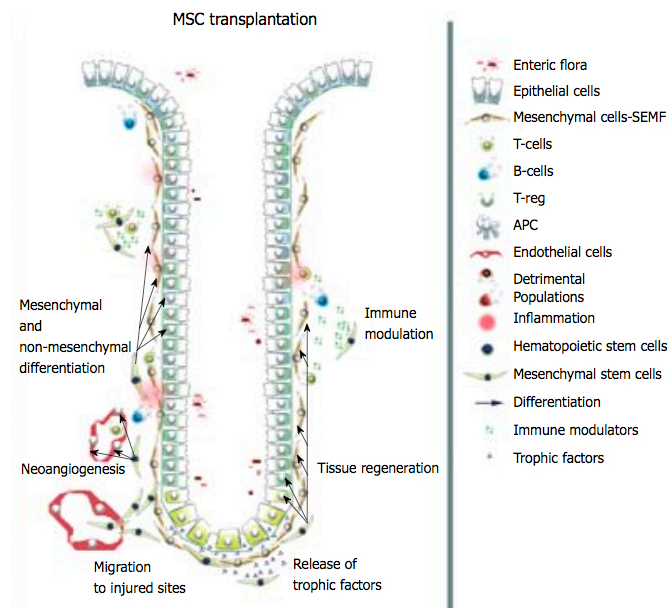
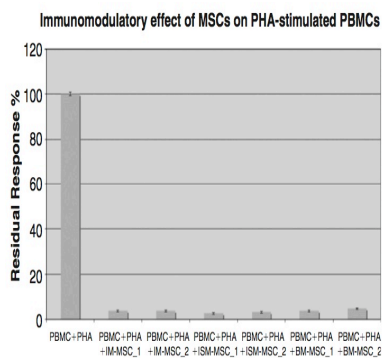
#### 4.7 - MSC intestinali possiedono funzioni trofiche ed immunomodulatorie utili per impieghi in contesti di IBD

Abbiamo isolato con successo popolazioni fibroblastoidi intestinali che mostrano il tipico profilo MSC: CD29+, CD44+, CD73+, CD105+, CD166+, CD14-, CD45-. Le MSC da mucosa intestinale (IM-MSC) appaiono anche CD117+, mentre le MSC da sottomucosa (ISM-MSC) mostrano dei subset CD34+. Le cellule sono apparse in grado di differenziare verso commissionamenti osteogenici, adipogenici ed angiogenici in vitro. Il commissionamento angiogenico è particolarmente

interessante: sono stati proposti approcci di terapia cellulare mirati al rimodellamento della microvascolatura mucosale, per migliorare la perfusione. Le MSC intestinali sono inoltre in grado di indurre il differenziamento e l'organizzazione architetturale di linee epiteliali intestinali (Caco-2 e T84) in co-culture tridimensionali in collagene. Questo aspetto trofico è centralmente interessante per approcci futuribili mirati alla stimolazione della riepitelizzazione, come ad esempio nelle ulcere e nelle fistole caratteristiche delle IBD. Le MSC di origine midollare, attualmente in trial clinici per la terapia delle IBD, non sono apparse in grado di indurre il differenziamento e l'organizzazione architetturale delle cellule epiteliali intestinali.



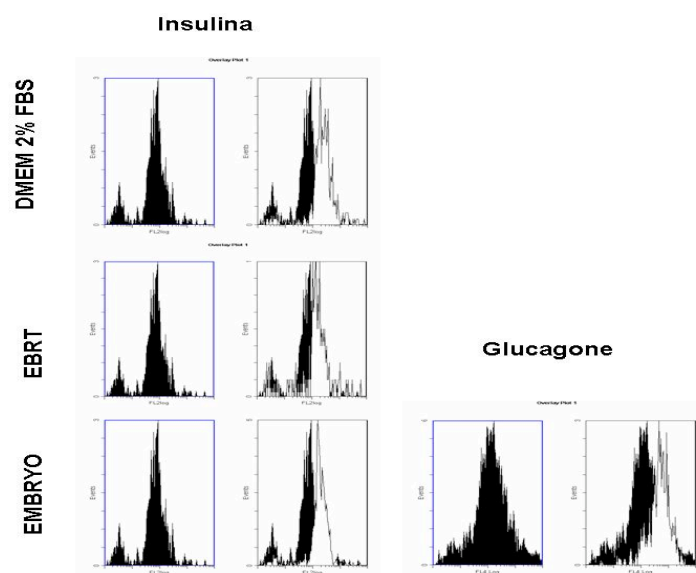
Ancora, le MSC intestinali hanno mostrato una potente attività immunomodulatoria soppressiva in co-cultura con PBMC eterologhe stimulate con PHA. Anche questa funzione potrebbe portare vantaggi in un contesto di trapianto quale quello delle malattie infiammatorie croniche intestinali.



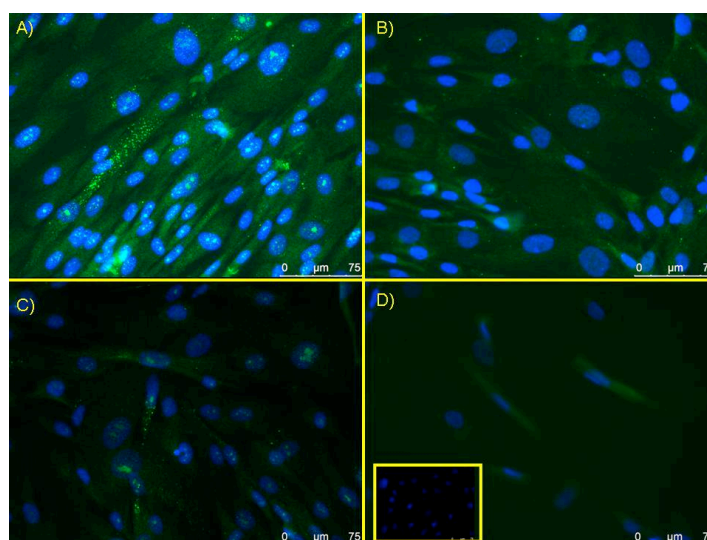


## 4.8 - Cellule MSC-simili da isole pancreatiche mostrano potenziale differenziativo endocrino

Le cellule pancreatiche PI-MSC-Like mostrano basalmente elevati livelli di marcatori di staminalità, hanno caratteristiche miste di progenitori endocrini e della vascolatura. Esse sono apparse responsive al differenziamento verso fenotipi pancreatici endocrini indotti mediante i protocolli DMEM2%FBS, EBRT, EMBRYO.

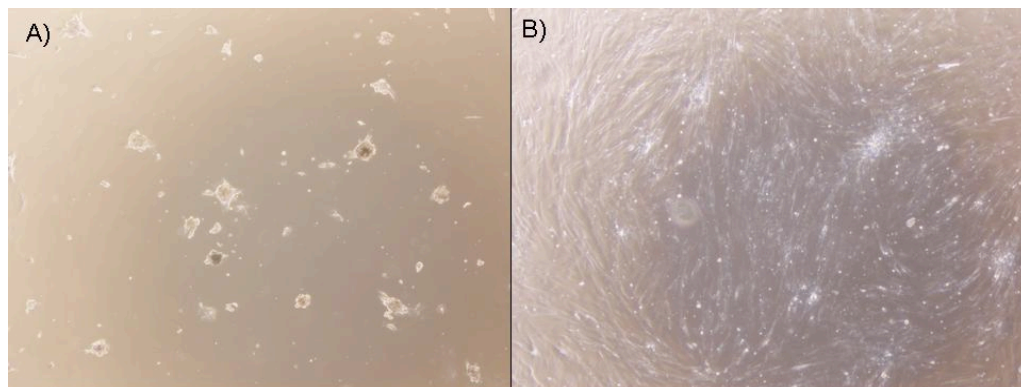


In questi grafici di citofluorimetria riportiamo in ascissa l'intensità di fluorescenza (FITC, PE) su scala logaritmica, ed in ordinata la conta cellulare. Sono confrontati gli istogrammi citofluorimetrici dei livelli di espressione di insulina e di glucagone tra popolazioni indotte (istogrammi bianchi) e popolazioni di controllo (istogrammi neri). Si evidenzia una risposta differenziativa verso commissionamenti pancreatici endocrini.

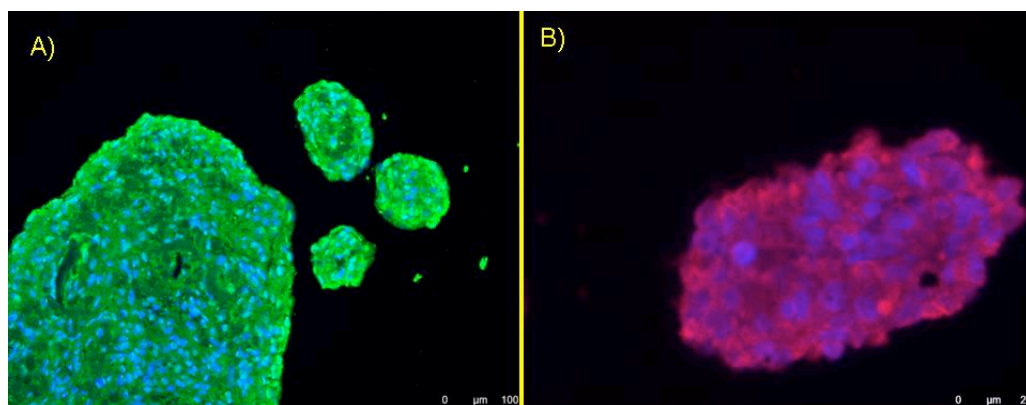


I risultati in citofluorimetria sono confermati alle indagini di immunofluorescenza su PI-MSC-Like indotte (A,B) e controllo (C,D). Si

osserva la presenza di glucagone in forma di granuli citoplasmatici (A, C); nel pannello B si evidenzia una parziale positività all'insulina.



Le cellule PI-MSC-Like possiedono una spiccata tendenza a formare aggregati in coltura, capacità osservata unicamente in queste colture. Si possono ottenere aggregati ILC mediante coltura in fiasche Ultra Low Attachment (A). In B i controlli in fiasche normali.



Negli aggregati ILC si osserva mediante immunofluorescenza la presenza di glucagone (A) e del marcatore di progenitori pancreatici Nestina (B).

Gli aggregati isola-simili sono stati premarcati con traccianti fluorescenti e trapiantati in un modello animale di diabete mediante infusione in vena porta, ovvero la stessa procedura utilizzata nel trapianto di isole pancreatiche. E' stata investigata la capacità delle cellule trapiantate di avere un effetto sul fenotipo diabetico.

#### 4.9 – Cellule MSC-simili da isole pancreatiche trapiantate in ratti STZ-diabetici hanno effetto sul fenotipo diabetico

Il trapianto di cellule di derivazione pancreatica ha avuto effetto sul fenotipo diabetico dei ratti, mentre il trapianto di cellule di origine midollare non ha avuto effetti. Il grafico riportato descrive l'andamento del consumo di acqua dal giorno dell'iniezione della molecola streptozotocina, STZ (giorno 0). L'effetto diabetogeno della STZ si

evidenza a partire dal giorno successivo all'iniezione. I ratti 1, 2, 3, 5, 12 costituiscono il gruppo di controlli sani, non trattati con STZ: essi assumono da 22 a 25 mL di acqua al giorno. I ratti 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 costituiscono il gruppo dei trattati (ratti diabetici su cui viene effettuato o meno il trapianto di ILCs): gli animali assumono fino a 180 mL di acqua al giorno, ed il consumo tende all'aumento. Nello specifico i ratti 6 e 11 sono controlli diabetici che non ricevono trapianti: i consumi di acqua si mantengono elevati e tendono all'aumento. Il ratto diabetico 4 ha ricevuto un trapianto di BM-MSC (giorno 2 post-STZ) e mostra solo un leggero calo del consumo di acqua, imputabile probabilmente al recupero nel giorno post trapianto, ma dal giorno immediatamente successivo i consumi di acqua si allineano con quelli dei soggetti diabetici; ciò potrebbe essere imputabile al fatto che, come ci si aspetta, le BM-MSC non abbiano effetto sul controllo della glicemia e dell'anabolismo dei nutrienti. I ratti diabetici 7, 8, 9, 10 hanno ricevuto il trapianto di ILC di cellule PI-MSC-Like. L'animale 9 è deceduto durante l'operazione per trombosi venosa portale nel sito di iniezione. Gli animali 7, 8, 10 mostrano un profilo di consumo di acqua che si discosta alquanto dai controlli diabetici: il consumo scende notevolmente nei 2/3 giorni successivi al trapianto, per poi risalire progressivamente ai livelli dei diabetici. Ciò potrebbe essere imputabile ad una prolungata sofferenza post trapianto, ma gli animali non hanno evidenziato segni o comportamenti suggestivi di grave sofferenza. L'andamento di consumo di acqua è inoltre diverso da quello del ratto diabetico 4 che ha subito l'operazione chirurgica. Questo effetto potrebbe dunque dipendere da un miglioramento nel controllo glicemico mediato dalle cellule trapiantate. La transitorietà dell'effetto potrebbe dipendere dalla perdita delle cellule impiantate, rigettate dal sistema immunitario dell'ospite per via della natura xenotropa del trapianto.

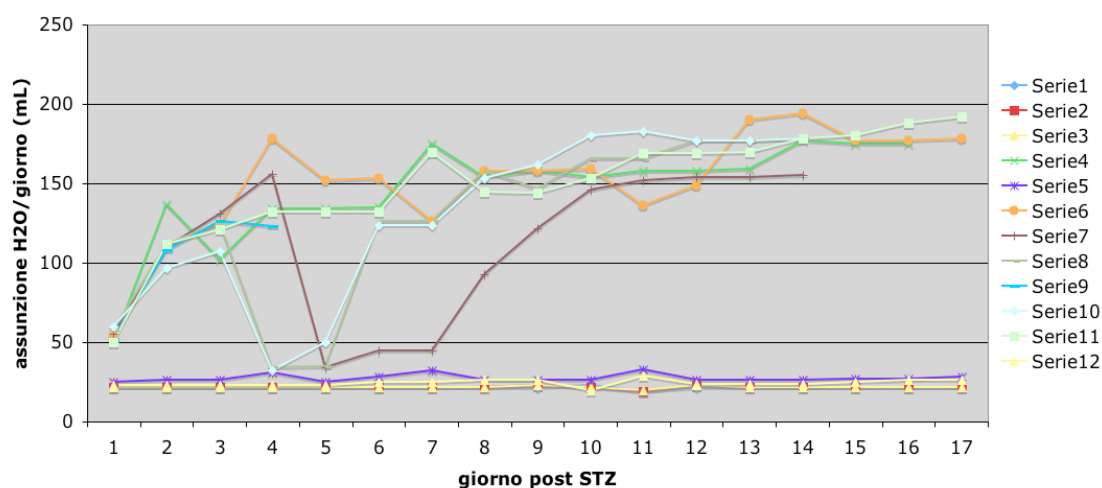


Grafico del consumo di acqua dal giorno di iniezione di STZ. Le serie corrispondono al numero dei ratti. Il ratto 4 riceve trapianto al giorno 2; i ratti 8 e 10 ricevono il trapianto al giorno 3, i ratti 7 e 9 ricevono il trapianto al giorno 4.

Riportiamo la variazione ponderale negli animali: anche questi dati mostrano andamenti diversi tra il gruppo di controlli sani, il gruppo di controlli diabetici ed il gruppo dei diabetici trapiantati con cellule pancreatiche. I ratti sani (1, 2, 3, 5, 12) aumentano progressivamente di peso come atteso, con variabilità interindividuali. I ratti diabetici (6, 11) tendono a perdere peso, poichè l'assenza di insulina impedisce l'anabolismo dei nutrienti assunti. Interessante è notare che il peso del ratto diabetico trapiantato con BM-MSC ha un andamento assimilabile a quello dei controlli diabetici: il trapianto non appare influenzare la diminuzione di peso. I ratti 7, 8, 10 che ricevono trapianto di cellule pancreatiche mostrano un andamento intermedio: il loro peso rimane stabile. Il ratto 7 mostra anzi un recupero ed una tendenza all'aumento.

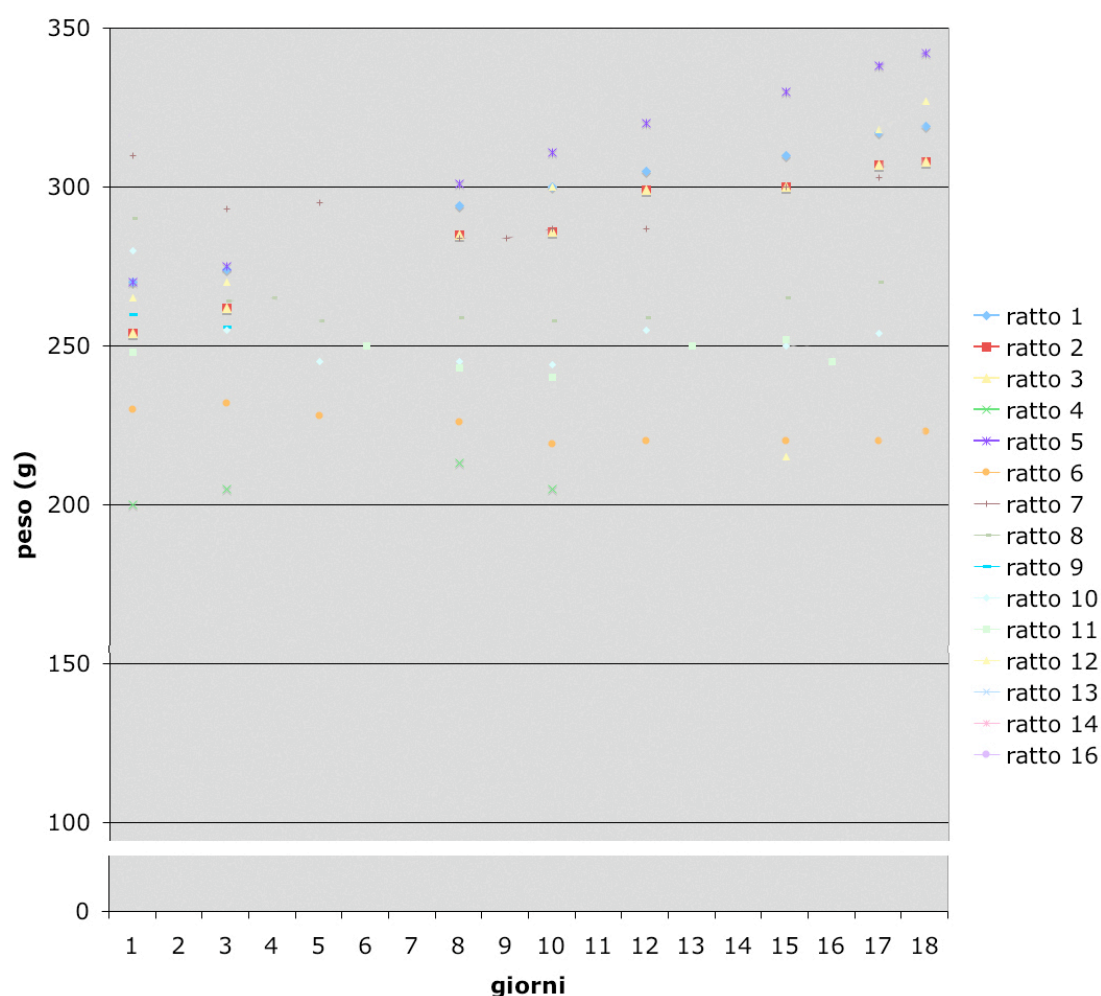


Grafico sulla variazione ponderale dei ratti dal giorno di iniezione di STZ. Le serie corrispondono al numero dei ratti. Il ratto 4 riceve trapianto al giorno 2; i ratti 8 e 10 ricevono il trapianto al giorno 3, i ratti 7 e 9 ricevono il trapianto al giorno 4.

Si riportano gli andamenti delle glicemie degli animali. La misurazione della glicemia è stata effettuata ogni 2-3 giorni e nello stesso orario della

giornata, ma gli animali sono lasciati liberi di assumere cibo *ad libitum*, di conseguenza le letture non sono uniformate rispetto alla distanza dal pasto. Gli animali sani possiedono glicemie comprese tra i 110 ed i 140 mg/dL; gli animali trattati raggiungono glicemie di 500 - 600 mg/dL; le glicemie reali superiori ai 600 mg/dL sono fuoriscala per la lettura elettronica con lo strumento adottato e sono state dunque riportate al limite rilevabile (600mg/dL). Gli andamenti delle glicemie appaiono altalenanti. Da sottolineare la tendenza alla diminuzione della glicemia in ratti trapiantati con cellule pancreatiche; questo andamento, associato al recupero del peso, è apprezzabile nel ratto 7 ed in maniera meno significativa ratti 8 e 10. Le glicemie dei ratti diabetici che hanno ricevuto trapianti appaiono mediamente inferiori a quelle dei ratti diabetici non trapiantati. La numerosità delle misurazioni è però ancora limitata, inoltre il limite di rilevanza dello strumento (600mg/dL) non ci permette di calcolare medie poichè molti valori risultano fuoriscala. I prossimi esperimenti verranno condotti in modo da misurare la glicemia ad intervalli più brevi e dopo un tempo uniformato di limitazione dell'assunzione di cibo per ottenere dati più significativi.

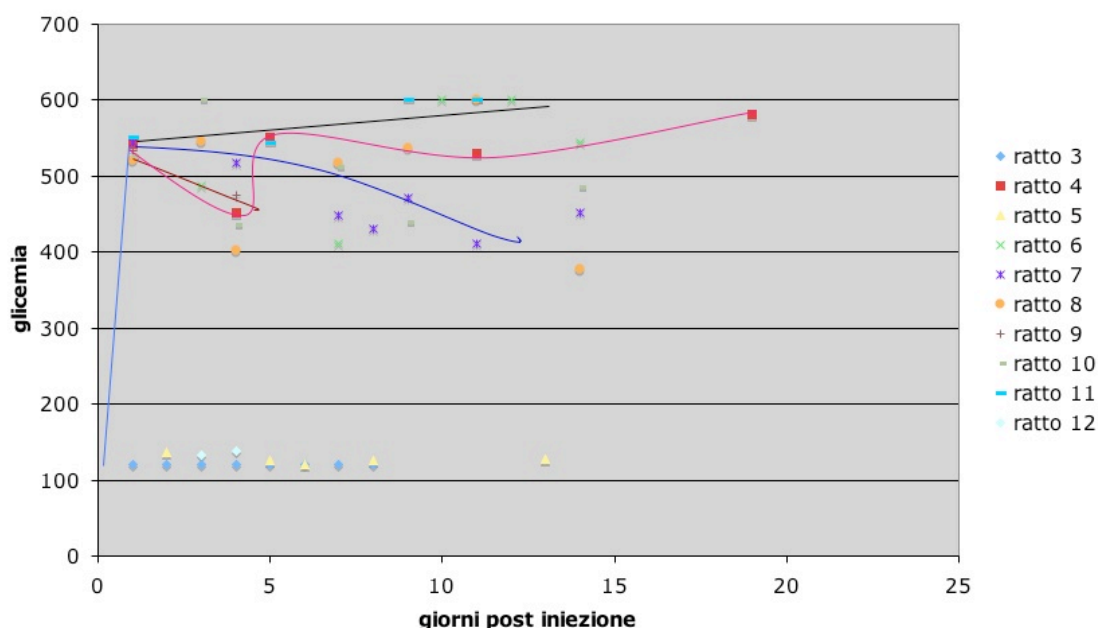


Grafico delle glicemie dal giorno di iniezione di STZ. Le serie corrispondono al numero dei ratti. Sono tracciate le linee di alcuni andamenti significativi. Il ratto 4 riceve trapianto al giorno 2; i ratti 8 e 10 ricevono il trapianto al giorno 3, i ratti 7 e 9 ricevono il trapianto al giorno 4. Al 17° giorno post trattamento i tessuti degli animali sono stati fissati per indagini istologiche e di immunofluorescenza: queste indagini potranno evidenziare l'attecchimento e/o l'infiltrato infiammatorio di rigetto nelle sedi di trapianto. L'accumularsi di una casistica più ampia potrà dare significatività statistica ai dati raccolti.

Questi risultati, ancorché preliminari, suggeriscono che il trapianto di MSC-like derivate da isole pancreatiche umane potrebbe indurre modifiche migliorative del fenotipo diabetico indotto da STZ nel modello animale utilizzato.



## 5 – Bibliografia

*"E quindi uscimmo a riveder le stelle."*

*(Alighieri D. Canto XXXIV. Div Comm 1315; 139)*

1. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.* 2001;7:393-395.
2. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287:1433-1438.
3. Haynesworth SE, Barber MA, Caplan IA. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13:69-80
4. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou C, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol.* 1997;151:1273-1280
5. Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T. Human neural stem cells: Isolation, expansion and transplantation. *Brain Path.* 1999;9:499-513
6. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14720-14725.
7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:7634-7638
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145-1147
9. Orkin S. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol.* 1998;42:927-934 1
10. Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, Wagner EF. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev.* 1997;62:137-145.
11. Blomberg M, Rao S, Reilly J, et al. Repetitive bone marrow transplantation in nonmyeloablated recipients. *Exp Hematol.* 1998;26:320-324
12. Baum C, Weissman I, Tsukamoto A, Buckle A, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:2804

13. Ogawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single 34-low/ negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273:242-245
14. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7:1028-1034.
15. Goodell M, Brose K, Paradis G, Conner A, Mulligan R. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-1806
16. Goodell M, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of 34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3:1337-1345
17. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med*. 1996;2:1329-1337
18. Michallet M, Philip T, Philip I, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol*. 2000;28:858-870.
19. Kawashima I, Zanjani E, Almajida-Porada G, Flake A, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood*. 1996;87:4136-4142
20. Szilvassy SJ, Fraser CC, Eaves CJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long-term lympho-myelopoietic repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:8798-8802.
21. Nolte J, Dao M, Wells S, Smogorzewska E, Kohn D. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2414-2419
22. Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol*. 1998;36:249-266
23. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705

24. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;401:390-394
25. Jackson K, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107:1395-1402.
26. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:528-530
27. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie K, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109:337-346
28. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002;8:607-612
29. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;98:10344-10349
30. Kopen G, Prockop D, Phinney D. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10711-10716
31. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;15:364-370
32. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164:247-256
33. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290:1779-1782
34. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HE. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-1779.
35. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168-1170
36. Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000;31:235-240



37. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32:11-16
38. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-377
39. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6:1229-1234
40. Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, Rowley SD, Appelbaum FR, McNiece IK. Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates. *Blood*. 1995;85:1995-2006
41. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood*. 2001;98:2008-2013.
42. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1341-1346.
43. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:500-504.
44. Kikyo N, Wolffe AP. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci*. 2000;113:11-20.
45. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416:542-545.
46. Ying QY, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002;416:545-548.
47. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Investigation*. 2002;96:1291-1302.
48. Jiang Y, Jahagirdar B, Reyes M, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-49.
49. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385:810-813.

50. Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science*. 2001;291:868-871
51. Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol*. 2000;2:879-887.
52. Tsai RVL, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Develop Cell*. 2002;2:707-712
53. Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Sdifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell*. 2000;103:1099-1109.
54. Suzuki A, Zheng YY, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*. 2002;156:173-184.
55. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95:379-391.
56. Scholer HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*. 1989;8:2543-2550.
57. Rosfjord E, Rizzino A. The octamer motif present in the Rex-1 promoter binds Oct-1 and Oct-3 expressed by EC cells and ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;203:1795-1802.
58. Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*. 1998;18:1866-1878.
59. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345:686-692.
60. Pikarsky E, Sharir H, Ben-Shushan E, Bergman Y. Retinoic acid represses Oct-3/4 gene expression through several retinoic acid-responsive elements located in the promoter-enhancer region. *Mol Cell Biol*. 1994;14:1026-1038.
61. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, sdifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24:372-376.
62. Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol*. 2001;29:1361-1370.

63. Tisdale JF, Dunbar CE. Plasticity and hematopoiesis: Circe's transforming potion? *Curr Opin Hematol.* 2002;9:268-273.
64. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001;98:2615-2625.
65. Bjornson C, Rietze R, Reynolds B, Magli M, Vescovi A. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999;283:354-357.
66. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 2000;288:1660-1663.
67. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, et al. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med.* 2002;8:268-273.
68. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet.* 12:266-73. 1999;12:266-273.
69. Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet.* 1995;10:453-460.
70. Takahashi - Yamanaka – iPS Cells
71. Lindvall O. Parkinson disease. Stem cell transplantation. *Lancet.* 2001;358:Suppl:S48.
72. Prokop Dj. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276: 71-74
73. Rehman J, Li J, Orschell CM, March K. Peripheral blood Endothelial Progenitor Cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* . 2003; 107:1164-1169
74. Camargo F, Finegold M, Goodel M. Hematopoietic mielomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners *J Clin Invest.* 2004; 113:1266-1270
75. Cen H, Lin MF, Huang H, Cai Z. Monocytic differentiation of bone-marrow derived hematopoietic precursors controlled by mesenchymal stem cell in absence of exogenous hematopoietic growth factors (in process) *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 2004; 37(2):139-144
76. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte cells adhere on injured

endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003 14; 93(10):980-989

77. Lu P, Blesch A, Tusynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation or artifact? *J Neurosci Res* 2004 15; 77(2):174-91

78. Friedenstein AJ, Chaikhjan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cells Tissue Kinet* 1987; 20: 263

79. Bianco P, Riminucci M, Gronthos, Gehron Robey P. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19(3):180-192

80. Minguell J. J., Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* 2000; 33:881-887.

81. Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells but not hematopoietic cells. *Blood* 2004; 104:290-294

82. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hem* 2000; 28: 875-884

83. Huang S, Terstappen LWMM. Formation of hematopoietic micro-environment and hematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992; 360: 745

84. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD 34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000; 18: 1-9

85. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34 sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 1992; 148:267-271

86. Pece Barbara N, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Journal of Biol Chem* 1999; 274(2):584-594

87. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognize an epitope on endoglin. *Biochem and Biophys Res Comm* 1999; 265:134-139

88. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147

89. Barry F, Boynton R, Murphy M, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem and Biophys Res Comm* 200; 289: 519-524
90. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4): 655-63
91. Thomson TM, Rettig WJ, Chesa PG, Green SH, Mena AC, Old LJ. Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. *Exp Cell Res* 1988; 174: 533.
92. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Lambertenghi Deliliers G. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hem* 2002; 30: 783-791.
93. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hem* 2003; 31:1323-1330
94. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999; 103:697-705
95. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995 18: 1417-1426
96. Wulf GG, Jackson KA, Goodell M. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hem* 2001 29: 1361-1370
97. Falla N, Van Vlasselaer P, Bierkens J et al. 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of murine bone marrow. *Blood* 1993; 82:3580-3591
98. Gronthos S, Zanettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003 116:1827-1835
99. Di Girolamo CM, Stokes D, Colter DC, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greater potential to propagate and differentiate. *Br J Hematol.* 1999; 107:275-281
100. Seshi B, Kumar S, King D. Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis. *Blood cells Mol Dis.* 2003; 31:268-25

101. Jackson KA, Snyder DS, Goodell MA. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells* 2004; 22(2):180-187
102. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal human mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704
103. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with marrow-derived cells. *Arch Dermatol.* 2003 Apr; 139(4):510-516
104. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Ringdén O et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41
105. Horwitz EM, Prockop DJ et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999 Mar; 5(3):309-313
106. Ventura C, Maiolo M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2004 May 28; 279(22):23574-23579
107. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehringer, Bornhauser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004; 22:377-384
108. Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 2000 Jun;15(3):144-60. Review.
109. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001 Feb 7;285(5):643-7.
110. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease* 2001; 7(3):226-236
111. Wirtz S, Neurath MF. Gene Transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gene Therapy* 2003 10, 854-860
112. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
113. Riddle RH. Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease – Kirsner. *Inflammatory Bowel Disease.* Wilkins and Wilkins; 1995. 517-52

114. Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, et al. IGF-I and procollagen alpha1 (I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G1307-22
115. Mc Kaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-82
116. Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Goke M, Gray T, Podolsky DK, et al. Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol* 1997; 273:G1341-8
117. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: C183-201
118. Joyce NC, Haire MF, Palade GE. Morphologic and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1987;92:68-81
119. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J* 1996; 10:731-40
120. Podolsky DK. Healing the epithelium: solving the problem from two sides. *J Gastroenterol* 1997; 32:122-6
121. McKaig BC, Makh SS, Hawkey CJ, Podolsky DK, Mahida YR. Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* 1999; 276: G1087-93
122. Andoh A, Fujino S, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14:33-7
123. Bajaj-Elliott M, Poulsom R, Pender SL, Wathen NC, MacDonald TT. Interactions between stromal cell-derived keratinocyte growth factor and epithelial transforming growth factor in immune-mediated crypt cell hyperplasia. *J Clin Invest* 1998; 102:1473-80
124. von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73
125. Fritsch C, Swietlicki EA, Lefebvre O, Keding M, Iordanov H, Levin MS et al. Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110:1629-41

126. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003; 17:1709-13
127. Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M et al. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:317-24
128. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune response of the intestine. *Gastroenterology* 2003; 124:1866-78
129. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974;141:537-61
130. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;8:1011-7
131. Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitair M, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-46
132. Bamba S, Lee CY, Brittan M, Preston SL, Direkze NC, Poulson R, Alison MR, Wright NA, Otto WR. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in interleukin-10 knockout colitic mice. *J Pathol* 2006 Jun;209(2):265-73
133. Brittan M, Chance V, Elia G, Poulson R, Alison MR, Macdonald TT, et al. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;128:1984-95
134. Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone Marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 2002;50:752-7
135. Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H. Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture. *Int J Exp Path* 2005;86:219-229
136. Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, Brunner M, Scholmerich J, Falk W, et al. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures. *Scand J. Gastroenterol* 2001; 36:389-98
137. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-22



138. Krampera M, Glennie S, Dazzi F et al. Bone Marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101(9):3722
139. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42
140. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. Human bone marrow stromal cell suppress t-lymphocyte induced by cellular or nonspecific stimuli. *Blood* 2002;99:3838
141. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM et al. Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implication in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389
142. Crisan M et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313, September 11, 2008
143. da Silva Meirelles et al. In vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. Published online June 19, 2008. 10.1634/stemcells.2007-1122.
144. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007 Feb 21;7:11. PMID: 17313666
145. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev.* 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]
146. Gronthos S et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13625-30 2000)
147. Gronthos S, et al - Human dental pulp stem cells: characterization and developmental potential. *Adult Stem Cells*. Humana Press Inc. pp. 67–82. 2004
148. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42
149. Rizzo R, Campioni D, Stignani M, Melchiorri L, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Moretti S, Cuneo A, Lanza F, Baricordi

OR. [A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells.](#) Cytotherapy 2008; 10(4): 364-375.

150. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. [Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2.](#) Blood 2008; 111(3): 1327-33.

151. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, Yu Z, Li B, Xu C, Li Y, Wang J, Hu J, Lou X, Chen H. [The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study.](#) Leukemia 2008; 22(3): 593-599.

152. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews : Immunology 2008 8: 726-736.

153. Campioni D, Rizzo R, Stignani M, Melchiorri L, Ferrari F, Moretti S, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Cuneo A, Baricordi O, Lanza F. A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. Cytometry 2009, 76, 225-230.

154. Guney MA, Gannon M. Pancreas cell fate. [Birth Defects Res C Embryo Today.](#) 2009 Sep;87(3):232-48.

155. Lehmann R, Zuellig RA, Kugelmeier P, Baenninger PB, Moritz W, Perren A, Clavien PA, Weber M, Spinas GA. Superiority of small islets in human islet transplantation. [Diabetes.](#) 2007 Mar;56(3):594-603.

156. Soria B. [In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells.](#) Differentiation. 2001 Oct;68(4-5):205-19.

157. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, Verrecchia F, Larghero J. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. [Diabetes Metab.](#) 2009 Apr;35(2):85-93.

158. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. [Diabetes.](#) 2001 Mar;50(3):521-33.

159. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, Verrecchia F, Larghero J. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. [Diabetes Metab.](#) 2009 Apr;35(2):85-93.

160. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. [Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.](#) N Engl J Med. 2000 Jul 27;343(4):230-8.

161. Teague et al. Pancreatic alfa cell differentiation by mesenchyme-to-epithelial transition in cell based therapies in children
162. [Johansson U](#), [Rasmusson I](#), [Niclou SP](#), [Forslund N](#), [Gustavsson L](#), [Nilsson B](#), [Korsgren O](#), [Magnusson PU](#). Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. [Diabetes](#). 2008 Sep;57(9):2393-401.
163. [Eberhardt M](#), [Salmon P](#), [von Mach MA](#), [Hengstler JG](#), [Brulport M](#), [Linscheid P](#), [Seboek D](#), [Oberholzer J](#), [Barbero A](#), [Martin I](#), [Müller B](#), [Trono D](#), [Zulewski H](#). Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. [Biochem Biophys Res Commun](#). 2006 Jul 7;345(3):1167-76.
164. Attali M et al. Control of beta cell differentiation by the pancreatic mesenchyme.
165. Banerjee M, Bhonde RR. [Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation](#). [JOP](#). 2003 Jul;4(4):137-45.
166. [Xiao M](#), [An L](#), [Yang X](#), [Ge X](#), [Qiao H](#), [Zhao T](#), [Ma X](#), [Fan J](#), [Zhu M](#), [Dou Z](#). Establishing a human pancreatic stem cell line and transplanting induced pancreatic islets to reverse experimental diabetes in rats. [Sci China C Life Sci](#). 2008 Sep;51(9):779-88.
167. [Huang H](#), [Tang X](#). Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. [Lab Invest](#). 2003 Apr;83(4):539-47.
168. Zhao M et al. Evidence for the presence of stem cell-like progenitor cells in human adult pancreas. [J endocrinol](#) 2007.
169. [Mato E](#), [Lucas M](#), [Petritz J](#), [Gomis R](#), [Novials A](#). Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. [Biochem J](#). 2009 Jun 26;421(2):181-91.
170. Reto M. MSC derived from human exocrine pancreas express transcription factors implicated in  $\beta$  cell development.
171. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. [In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue](#). [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2000 Jul 5;97(14):7999-8004.
172. [Lin HT](#), [Chiou SH](#), [Kao CL](#), [Shyr YM](#), [Hsu CJ](#), [Tarng YW](#), [Ho LL](#), [Kwok CF](#), [Ku HH](#). Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. [World J Gastroenterol](#). 2006 Jul 28;12(28):4529-35.

173. [Seeberger KL](#), [Dufour JM](#), [Shapiro AM](#), [Lakey JR](#), [Rajotte RV](#), [Korbutt GS](#). Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. [Lab Invest](#). 2006 Feb;86(2):141-53.
174. Giddings J.C. et al. Separation of cells by field-flow fractionation and related methods Cell Separation Science and Biotechnology ACS Symp. Series n°464 (Kompala D.S. and Todt. eds) pp.128-144 American Chemical Society 1991
175. Gallo R et al. Generation and expansion of multipotent mesenchymal progenitor cells from cultured human pancreatic islets. Cell Death and Differentiation (2007), 1–12

## 6 - Lista delle Pubblicazioni Scientifiche

### *Journal Articles*

**1. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro.**

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, **Lanzoni G**, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. *BMC Dev Biol.* 2007 Feb 21;7:11. PMID: 17313666

**2. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells**

Rizzo R, Campioni D, Stignani M, Melchiorri M, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, **Lanzoni G**, Moretti S, Cuneo A, Lanza F, Baricordi OR. *Cytotherapy* 2008; 10(4):364-75. PMID: 18574769

**3. Inflammatory Bowel Disease: moving toward a stem cell-based therapy**

**Lanzoni G**, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. *World J Gastroenterol* 2008. Aug 7;14(29):4616-26. PMID: 18698675

**4. Thrombocytopenia with Absent Radii (TAR) syndrome: from hemopoietic progenitor- to mesenchymal stromal cell disease?**

Bonsi L, Marchionni C, Alviano F, **Lanzoni G**, Franchina M, Costa R, Grossi A, Bagnara GP. *Exp Hematol.* 2008 Nov 21 PMID: 19028006

**5. A decreased positivity for CD90 on human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs**

Campioni D, Rizzo R, Stignani M, Melchiorri L, Ferrari L, Moretti S, Russo A, Bagnara GP, Bonsi L, Alviano F, **Lanzoni G**, Cuneo A, Baricordi OR, Lanza F. *Cytom Part B-Clin Cytom.* 2008 Nov 4. PMID: 18985728

**6. A tag-less method to sort stem cells from clinical specimens and to separate mesenchymal from epithelial progenitor cells.**

Roda B, Reschiglian P, Zattoni A, Alviano F, **Lanzoni G**, Costa R, Di Carlo A, Marchionni C, Franchina M, Bonsi L, Bagnara GP. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009 Jul;76B(4):285-90. PMID: 19363787

**7. Gravitational field-flow fractionation of human hemopoietic stem cells**

Roda B, Reschiglian P, Alviano F, **Lanzoni G**, Bagnara GP, Ricci F, Buzzi M, Tazzari PL, Pagliaro P, Michelini E, Roda A. *J Chromatogr A.* 2009 Dec 25;1216(52):9081-7. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19647835

**8. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells**

Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, **Lanzoni G**, Di Tullio A, Costa R, Montanari M, Tazzari PL, Ricci F, Pasquinelli G, Orrico C, Grossi A, Prati C, Bagnara GP. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009 Jul-Sep;22(3):699-706. PMID: 19822086

**9. A Novel Stem Cell Tag-Less Sorting Method.**

Roda B, **Lanzoni G**, Alviano F, Zattoni A, Costa R, Di Carlo A, Marchionni C, Franchina M, Ricci F, Tazzari PL, Pagliaro P, Scalinci SZ, Bonsi L, Reschiglian P, Bagnara GP. *Stem Cell Rev.* 2009 Dec;5(4):420-7. PMID: 19826965

**10. Isolation of stem cell populations with trophic and immunoregulatory functions from human intestinal tissues: potential for cell therapy in inflammatory bowel disease.**

Lanzoni G, Alviano F, Marchionni C, Bonsi L, Costa R, Foroni L, Roda G, Belluzzi A, Caponi A, Ricci F, Tazzari PL, Pagliaro P, Rizzo R, Lanza F, Baricordi OR, Pasquinelli G, Roda E, Bagnara GP.

*Cytotherapy*. 2009;11(8):1020-31. PMID: 19929466

**11. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies and regulatory aspects at the round table.**

Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, De Bari C, De Waele P, Dominici M, Evangelista M, Falk W, Hennerbichler S, Hess DC, Lanzoni G, Liu B, Marongiu F, McGuckin C, Mohr S, Noll ML, Ofir R, Ponsaerts P, Romagnoli L, Solomon A, Soncini M, Strom S, Surbek D, Sankar V, Wolbank S, Zeisberger S, Zeitlin A, Zisch A, Borlongan CV.

*Stem Cells Dev*. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print] PMID: 19947828

**12. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: pluripotency and stemness characteristics.**

Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, Orrico C, Lanzoni G, Buzzi M, Tazzari PL, Pagliaro P, Stella A, Bagnara GP.

*Cytotherapy*. In press 2010.

**Conference Abstracts and Presentations**

**1. Isolation and in vitro differentiation of human Mesenchymal Stem Cells from new alternative sources: fetal membranes and placenta**

Fossati V, Pierdomenico L, Alviano F, Arpinati M, Marchionni C, Franchina M, Croci S, Bonsi L, Cantore A, Lanzoni G and Bagnara GP.

*VI National Meeting of the "National Institute of Biostructures and Biosystems", Naples, Italy, 4-6 November 2004. Poster*

**2. In vitro differentiation of human Mesenchymal Stem Cells from various sources**

Fossati V., Pierdomenico L., Alviano F., Arpinati M., Marchionni C., Franchina M., Cantore A., Lanzoni G., Bonsi L., Bagnara GP

*"Stem Cells for a new Medicine" Rapallo, Italy. November 19-20, 2004. Oral Communication*

**3. Human extraembryonic tissues: a novel source of Mesenchymal Stem Cells.**

Fossati V, Alviano F, Pierdomenico L, Arpinati M, Marchionni C, Lanzoni G, Bonsi L, Franchina M, Bagnara GP.

*81° SIGO National Conference. Bologna, Italy. September 20-24, 2005. Oral Communication*

**4. Mesenchymal Stem Cells from the gastrointestinal stroma: isolation, in vitro expansion and characterization.**

Lanzoni G., Belluzzi A., Roda G., Alviano F., Bonsi L., Marchionni C., Tonon F., Caponi A., Tuci A., Roda A., Bagnara GP., Roda E..

*Digestive Disease Week 2007. Washington DC, USA. May 19-24, 2007. Poster, Meeting Abstract – Abstracted on: GASTROENTEROLOGY Volume: 132 Issue: 4 Pages: A553-A554 Supplement: Suppl. 2 Published: APR 2007*

**5. Angiogenic Potential Of Stem Cells Isolated From Dental Pulp.**

Marchionni C., Alviano F., Lanzoni G., Montanari M., Prati C. and Bonsi L.

*42nd annual meeting of IADR-Continental European and Israeli Division. Thessaloniki, Greece. Sept 26-29, 2007. Poster*

**6. Una popolazione di cellule multipotenti può essere isolata dalla parete dell'aorta toracica umana.**

Pacilli A, Foroni L, Orrico C, Lanzoni G, Alviano F, Bagnara GP, Pasquinelli G

*XVIII Incontro scientifico annuale del gruppo italiano di patologia ultrastrutturale SIAPEC-International Academy of Pathology. Bari, Italy Feb 15-16, 2008. Poster, Meeting abstract*

**7. Isolation, sorting and improvements in differentiation yield of human mesenchymal stem cells by tag-less, flow assisted fractionation.**

Roda B., Reschiglian P., Zattoni A., Alviano F., **Lanzoni G.**, Costa R., Marchionni C, Di Tullio A, Bagnara GP.

*AACC 40th Oak Ridge Conferente. The Fairmont - San Jose , CA April 17-18, 2008. Poster*

**8. A tag-less method for human mesenchymal stem cells isolation and sorting.**

**Giacomo Lanzoni**, Barbara Roda, Francesco Alviano, Andrea Zattoni, Roberta Costa, Cosetta Marchionni, Alessandro Di Tullio, Laura Bonsi, Pierluigi Reschiglian, Gian Paolo Bagnara

*ESH-EHA Scientific Workshop "Mesenchymal Stem Cells" Mandelieu-la-Napoule - France June 30 - July 2, 2008. Poster*

**9. Produzione di molecole solubili HLA-G da parte di cellule staminali mesenchimali attivate in vitro con IL-10: un marker per la definizione "a priori" della capacità tolerogenica**

Stignani M, **Lanzoni G**, Melchiorri L, Bonsi L, Alviano F, Costa R, Balboni A, Grappa MT, Campioni D, Ricci F, Tazzari PL, Lanza F, Bagnara GP, Rizzo R, Baricordi OR.

*XV Congresso Nazionale Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) - Bari, Italy, Oct 2-4, 2008. Abstract (Awarded)*

**10. Mesenchymal Stromal Cells from gastrointestinal tissues display multiple differentiation potential, exert trophic and immunoregulatory functions**

**G. Lanzoni**, F. Alviano, C. Marchionni, R. Costa, L. Foroni, G. Roda, L. Bonsi, M. Franchina, F. Ricci, P.L. Tazzari, R. Rizzo, F. Lanza, O.R. Baricordi, G. Pasquinelli, E. Roda, G.P. Bagnara, .

*EMIG 2008 - 6<sup>th</sup> European Mucosal Immunology Group Meeting Milan – Italy – Oct 8-10, 2008. Poster*

**11. A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells from different sources.**

**Evidences of discordant reactivity for various immunological markers.**

Lanza F , Rizzo R, Campioni D, Stignani A, Melchiorri L, Bagnara GP, **Lanzoni G**, Moretti S, Baricordi OR, Cuneo A. 2008

*Abstracted on: HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL Volume: 93 Pages: S120-S120 Supplement: Suppl. 2 Published: SEP 2008*

**12. Mesenchymal Stromal Cells and Placenta-derived cells: potential tools for Inflammatory Bowel Disease.**

Alviano F, **Lanzoni G**, Roda E, Bagnara GP.

*International Workshop on Placenta-derived cells for treatment of inflammatory disease: moving toward clinical application. – Brescia – Italy, Mar 13-14, 2009. Oral presentation*

**13. Stem cells from human intestinal and placental tissues: potential for IBD therapy**

**Lanzoni G**, Roda G, Roda E, Bagnara GP.

*Seminari Torinesi di Gastro-Epatologia 2009 - Cellule staminali: applicazioni in campo gastroenterologico ed epatologico – Torino- Italy, May 20, 2009. Oral presentation*

**14. CD34+ OCT4+ Human pancreatic islet-derived stem cells: endocrine/endothelial features and multidifferentiation potential**

**Lanzoni G**, Alviano F, Costa R, Marchionni C, Ricci F, Tazzari PL, Cavallari G, Foroni L, Pasquinelli G, Bonsi L, Santini D, Casadei R, Minni F, Bagnara GP.

*Workshop on Transplantation in the Hyperimmunized Patient – Joint Meeting IPITA-IXA – Venezia, Italy, Oct 12-14. 2009. Oral presentation*

*Abstracted on: Xenotransplantation. Volume: 16 Issue: 5 Pages: 327-327 Published: SEP-OCT 2009*

**15. CD34+ Human pancreatic islet-derived stem cells display endocrine/endothelial features and multidifferentiation potential**

**Lanzoni G**, Alviano F, Costa R, Marchionni C, Ricci F, Tazzari PL, Cavallari G, Foroni L, Pasquinelli G, Bonsi L, Pagliaro P, Santini D, Casadei R, Minni F, Bagnara GP.

*XXVII Conferenza nazionale di Citometria – Ferrara, Italy, Oct 14-17, 2009. Poster*





*"La scienza è sempre imperfetta.  
Ogni volta che risolve un problema,  
ne crea almeno dieci nuovi."*

George Bernard Shaw (1856 - 1950)